



ZÜRCHER HOCHSCHULE FÜR ANGEWANDTE WISSENSCHAFTEN
 DEPARTEMENT LIFE SCIENCES UND FACILITY MANAGEMENT
 INSTITUT UNR

Das Blackcurrant Reversion Virus bei Cassis (*Ribes nigrum*) in der Beerensammlung von ProSpecieRara (Riehen BS) - Virusfreimachung

Bachelorarbeit

von

Katharina Genucchi

Bachelorstudiengang 2015

Studienrichtung Umweltingenieurwesen, Vertiefung Biologische Landwirtschaft und Hortikultur

Abgabedatum: 25. Oktober 2018

1. Korrektur: Dipl. Ing. Gartenbau Julia Angstl
 ZHAW, Grüentalstrasse 14, 8820 Wädenswil
2. Korrektur: Dipl. Biologe Claudio Niggli (Auftraggeber)
 ProSpecieRara, Unter Brüglingen 6, 4052 Basel

Impressum

Schlagworte: *Ribes nigrum*, schwarze Johannisbeere, Cassis, Blackcurrant Reversion Virus, *Cecidophyopsis ribis*, Johannisbeergallmilbe, ProSpecieRara, Virusfreimachung, Thermotherapie, in-vitro-Kultivierung

Keywords: *Ribes nigrum*, Blackcurrant, Blackcurrant Reversion Virus, *Cecidophyopsis ribis*, Blackcurrant gall mite, big bud mite, ProSpecieRara, virus elimination, thermotherapy, in vitro cultivation

Zitiervorschlag: Genucci, K. (2018). Das Blackcurrant Reversion Virus bei Cassis (*Ribes nigrum*) in der Beerensammlung von ProSpecieRara (Riehen BS) - Virusfreimachung. Bachelorarbeit (unveröffentlicht), Wädenswil.

Adresse

Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften (ZHAW)
Institut für Umwelt und Natürliche Ressourcen (IUNR)
Grüentalstrasse 14
CH-8820 Wädenswil

Titelbild

obere Reihe (v.l.n.r.): Rundknospe, Strauch in der Einführungssammlung, verminderte Ernte; mittlere Reihe (v.l.n.r.): in-vitro-Pflänzchen, Cassis-Blüte; untere Reihe (v.l.n.r.): ausgetriebenes Steckholz, die Einführungssammlung Anfang März, geschädigtes in-vitro-Pflänzchen

Bilder in dieser Arbeit

Die Bilder und Grafiken stammen, wenn nicht anders vermerkt, von der Autorin. Sie wurden zwischen dem 02.03.2018 und dem 06.09.2018 aufgenommen.

Zusammenfassung

In dieser Bachelorarbeit wurden schwarze Johannisbeeren (*Ribes nigrum* L.) in der Einführungssammlung von ProSpecieRara (PSR) auf das Blackcurrant Reversion Virus (BRV) untersucht und es wurde nach einer Methode zur Virusfreimachung der infizierten Pflanzen gesucht.

PSR sammelt in der Einführungssammlung und in der nationalen Beerensammlung (beide in Riehen BS) diverse Beerenarten. Das Ziel ist, alte Sorten zu erhalten und Wissen darüber zu gewinnen. BRV ist die schlimmste Krankheit bei *R. nigrum*. Es verursacht grosse Ertragseinbussen und verändert die morphologischen Sorteneigenschaften - dies beeinträchtigt die Arbeit von PSR. Pflanzenviren können im Feld kaum bekämpft werden, bei einem Befall müssen die Pflanzen in der Regel entfernt werden. Dies ist für PSR aber nicht möglich, da dann die Sorten nicht erhalten werden können. Deshalb wurde nach einer anderen Lösung für dieses Problem gesucht.

Im ersten Schritt wurden anfangs März 2018 in der Einführungssammlung Proben von 20 verschiedenen Sorten für die RNA-Analyse (PT-PCR) sowie für Steckhölzer entnommen. Die Steckhölzer wurden in einer Wachstumskammer bewurzelt und danach einer Thermotherapie bis max. 34.5°C ausgesetzt. Zusätzlich wurden anfangs Juni 2018 in der Einführungssammlung von einigen beprobten Sorten diesjährige Triebe geschnitten. Im zweiten Schritt wurden aus den neu gebildeten Blattachselknospen der thermotherapierten Steckhölzer sowie der neugeschnittenen Triebe Meristeme plus einige Primordialblätter entnommen und auf Nährmedium (zuerst MS, später WPM) in-vitro kultiviert. Parallel zur Thermotherapie und der in-vitro-Kultivierung wurden die beprobten Pflanzen in der Einführungssammlung morphologisch auf Virussympptome untersucht.

Während der Bewurzelung und der Thermotherapie starben fast alle Steckhölzer aufgrund von Wurzelfrass ab. Auch während der in-vitro-Kultivierung starben beinahe alle in-vitro-Pflänzchen ab. Der Hauptgrund für das Absterben während der in-vitro-Kultivierung ist vermutlich eine Kombination aus exo- und endophytischen Mikroorganismen sowie der Oxidation von Polyphenolen. Diese haben die in-vitro-Pflänzchen sehr stark beeinträchtigt. Dementsprechend konnte keine zweite RNA-Analyse durchgeführt werden und es ist nicht klar, ob die Methode zur Virusfreimachung wirksam ist.

In in-vitro-Pflänzchen, welche von den im Juni geschnittenen Trieben stammten, wurden zudem Milben gefunden. Es waren vermutlich *Cecidophyopsis*-Arten, welche das Virus übertragen können und im Frühling bereits in die neugebildeten Knospen eingedrungen waren. Die Blattachselknospen diesjähriger Triebe sind für die Gewinnung von gesundem Material also nicht geeignet.

Die morphologischen Untersuchungen zeigten, dass die Symptome von BRV nicht regelmässig über die Pflanze verteilt sind und dass sie nicht immer klar erkennbar sind. Einerseits weil sie schwach ausgeprägt sind, andererseits weil nicht immer klar ist, welches ein Virussympptom und welches eine Sorteneigenschaft ist. Eine Ernteeinbusse konnte - im Rahmen der sehr kleinen Datenmenge - festgestellt werden.

Die Arbeit hat gezeigt, dass noch verhältnismässig wenig Wissen zur Virusfreimachung von *R. nigrum* vorhanden ist und dass sehr viele Faktoren dabei eine Rolle spielen. Das Thema sollte genauer untersucht und die in dieser Arbeit angewandten Methoden weiter verbessert werden.

Abstract

In this bachelor thesis, black currants (*Ribes nigrum* L.) from the introductory collection of ProSpecieRara (PSR) were examined for the Blackcurrant Reversion Virus (BRV) and a method for virus elimination in the infected plants was searched.

PSR collects various types of berries in the introductory collection and in the national berry collection (both in Riehen BS). The aim is to preserve old varieties and to gain knowledge about them. BRV is the worst disease in *R. nigrum*. It causes large yield losses and changes the morphological characteristics of the variety - this impairs the work of PSR. Plant viruses can hardly be eliminated in the field, and plants usually have to be removed if they are infested. However, removing is not a possibility for PSR because then, the varieties are not preserved. Therefore, a different solution to this problem was sought.

In the first step, samples for RNA analysis (PT-PCR) as well as wood samples were taken from the introductory collection of 20 different varieties at the beginning of March 2018. The cuttings were rooted in a growth chamber and then subjected to thermotherapy at a maximum temperature of 34.5°C. In addition, this year's shoots of some sampled varieties were cut at the beginning of June 2018 in the introductory collection. In the second step, meristems plus some primordial leaves were taken from the newly formed leaf axillary buds of the thermotherapized cuttings and the newly cut shoots and cultivated in vitro on nutrient medium (first MS, later WPM). Parallel to thermotherapy and in vitro cultivation, the sampled plants were morphologically examined for virus symptoms in the introductory collection.

During rooting and thermotherapy, almost all the cuttings died due to root damage. Also during in vitro cultivation almost all in vitro plants died. The main cause of death during in vitro cultivation is probably a combination of exo- and endophytic microorganisms and the oxidation of polyphenols. These have strongly affected the in vitro plants. Accordingly, a second RNA analysis could not be performed and it is not clear whether the method is effective.

In addition, mites were found in in vitro plants which came from the shoots cut in June. It was probably *Cecidophyopsis* species that could transmit the virus and had already penetrated the newly formed buds in spring. The leaf axillary buds of this year's shoots are therefore not suitable for obtaining healthy material.

The morphological investigations showed that the symptoms of BRV are not regularly distributed throughout the plant and that they are not always clearly recognizable. On the one hand because they are weakly pronounced, on the other hand because it is not always clear which is a virus symptom and which is a variety characteristic. A harvest loss could be determined - within the framework of the very small amount of data.

This thesis has shown that there is still relatively little knowledge available on the virus elimination in *R. nigrum* and that many factors play a role in this. The topic should be examined more closely and the methods used in this work should be improved.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Das Blackcurrant Reversion Virus und sein Vektor	4
2.1	Symptome	4
2.2	Diagnose	6
2.3	Zwei unterschiedliche Formen von BRV?	7
2.4	Übertragung, Gallmilbe, Bekämpfung	7
3	Virusfreimachung	11
3.1	Das konkrete Vorgehen im Versuch.....	13
4	Material und Methoden	15
4.1	Zeitplan.....	15
4.2	Schnitt des Pflanzenmaterials in der Sammlung	15
4.3	Probenvorbereitung und Präparation der Steckhölzer.....	16
4.4	Molekulare Analyse	19
4.5	Präparation der Steckhölzer & Bewurzelung	19
4.6	Thermotherapie	21
4.7	In-vitro-Kultivierung	22
4.7.1	Nährmedien	22
4.7.2	Präparation der Meristeme	23
4.7.3	Passagieren der in-vitro-Pflänzchen	25
4.8	Ergänzende morphologische Beschreibung	26
5	Resultate	27
5.1	Virusfreimachung.....	27
5.1.1	Molekulare Analyse	27
5.1.2	Bewurzelung und Thermotherapie	28
5.1.3	In-vitro-Kultivierung.....	32
5.2	Ergänzende Morphologische Beschreibung	36
5.2.1	Pflanzen im frühen Frühling (02.03.2018) & frühere Beobachtungen	36

5.2.2	Blüten (24.04.2018)	37
5.2.3	Blätter & Triebe (24.04.2018 & 10.06.2018)	38
5.2.4	Früchte (10.06.2018)	40
5.2.5	Informationen aus der Nationalen Datenbank	40
6	Diskussion	43
6.1	Bewurzelung & Thermotheapie	43
6.2	In-vitro-Kultivierung	44
6.2.1	Zeitpunkt und Art der Meristemgewinnung	44
6.2.2	Befall durch Mikroorganismen	44
6.2.3	Korkgewebe	45
6.2.4	Medienrezeptur	46
6.3	Morphologische Beschreibung	47
7	Fazit & Ausblick	49
8	Literaturverzeichnis	50
	Abbildungsverzeichnis	58
	Tabellenverzeichnis	61
	Anhang I: Beprobte Pflanzen	62
	Anhang II: Temperaturen in der Wachstumskammer	63
	Anhang III: Rezeptur der Nährmedien	64
	Anhang IV: Vergleich der Rezepturen	67

1 Einleitung

Ribes nigrum L., die schwarze Johannisbeere oder Cassis (Abbildung 1), gehört zusammen mit der roten und weissen Johannisbeere, sowie der Stachelbeere zu den bekannten essbaren Früchten der Gattung *Ribes* in der Familie der Grossulariaceae. *R. nigrum* bevorzugt gemässigttes Klima. Natürlicherweise kommt es in Nord- und Nordwesteuropa und in Nord- und Mittelasien vor (Bartha-Pichler, Frei, Kajtna & Zuber, 2006). In der Schweiz wird es gemäss Info Flora (2018) hauptsächlich kultiviert, kann gelegentlich aber auch verwildern.



Abbildung 1: Strauch in der Einführungsammlung (links) und Beeren von *R. nigrum* (rechts). (Quelle rechts: Colourbox)

Kultiviert werden *R. nigrum* und *R. rubrum* (rote Johannisbeere (Jones, 2000)) seit ca. 500-600 Jahren, wobei dies vermutlich in der Region Nordfrankreich / Belgien seinen Anfang nahm. Im grossen Stil werden sie erst seit Ende des 19. Jahrhunderts angebaut. Wo überall die beiden Arten früher kultiviert und konsumiert wurden, lässt sich mittels archäobotanischen Untersuchungen nur unzureichend herausfinden, da die Spuren nicht überall gleich gut konserviert sind und die Untersuchungen je nach Region zudem unterschiedlich intensiv sind. Im Laufe der Inkulturnahme und Züchtung wurde in den Wildbeständen von *R. nigrum* nach grösseren und mildereren Beeren gesucht und die beiden *Ribes*-Arten *R. dikuscha* und *R. ussuriensis* wurden eingekreuzt. Um Herkunft und Entwicklung der kultivierten *Ribes*-Arten besser aufzuschlüsseln, braucht es genaue Gen-Analysen. Heute fokussiert sich die Züchtung vor allem auf insekten- und krankheitsresistente Sorten (Bartha-Pichler et al., 2006; Wiethold, 2016).

R. nigrum eignet sich nur bedingt für den Frischverzehr - viele Sorten sind in ihrem Geschmack zu stark. Es wird deshalb häufig verarbeitet zu Konfitüren, Saft, alkoholischen Getränken oder wird zum Aromatisieren oder Färben von anderen Lebensmitteln verwendet. Früchte, Samen, Blätter und

Knospen, bzw. deren Inhaltsstoffe, können im medizinischen und dermatologischen Bereich eingesetzt werden und sind auch Teil der traditionell europäischen Medizin (siehe auch Abbildung 2) (Vagiri, 2012; Wiethold, 2016).



Abbildung 2: *R. nigrum* wird in der Medizin (links) und als Nahrungsmittel, z.B. als Likör oder Eis, verwendet. (Quellen: Links: <https://goo.gl/images/DSLv6X>, Mitte & Rechts Colourbox)

Der Anbau von *R. nigrum* ist heute in den gemässigten Gebieten Europas, Russlands, Neuseelands, Teilen Asiens und Nordamerikas recht weit verbreitet. Auch in der Schweiz wird es angebaut – dies hauptsächlich für den Frischverkauf. Der Grossteil der *Ribes*-Produktion kommt aus Europa, davon wird in Polen mit Abstand am meisten produziert (Mitchell, Brennan, Cross & Johnson, 2011; Schweizer Obstverband, 2014; Vagiri, 2012). In der Schweiz wird 2018 gemäss dem Schweizer Obstverband (2018) auf 15.2 ha *R. nigrum* angebaut. Das ist im Vergleich mit der schweizerischen Gesamtbeerenfläche 2018 von 945.3 ha ein sehr kleiner Anteil. In Lettland ist *R. nigrum* laut Zulfje et al. (2018) eine der wichtigsten Beerenkulturen. Die vielen interessanten Inhaltsstoffe – sei es für die Ernährung oder für andere Anwendungen – führten in den vergangenen Jahren zu mehr Interesse und Forschung (Vagiri, 2012).

ProSpecieRara (PSR) sammelt und kultiviert alte und seltene Sorten und Rassen, um sie vor dem Aussterben und Vergessen zu bewahren. Dadurch wird die Sorten- und Rassenvielfalt gefördert und der Genpool wird möglichst breit gehalten. Gesammelt werden unter anderem auch zahlreiche Sorten von *R. nigrum*. Sie werden zusammen mit anderen Beerenarten (*Rubus*, *Fragaria*, weitere *Ribes*) beispielsweise in der nationalen Beerensammlung in Riehen BS erhalten. Ebenfalls in Riehen ist die Einführungssammlung (siehe Abbildung 3). Dort werden Beerensorten aus unterschiedlichsten Quellen beobachtet und untersucht, morphologisch beschrieben und deren Sorte bestimmt. Ein Teil dieser Sorten wird später in die nationale Beerensammlung aufgenommen.



Abbildung 3: Die Karte (links) zeigt die Lage der Einführungssammlung innerhalb der Gemeinde Riehen BS (Koordinaten: 2'616'746, 1'269'796). Das Luftbild zeigt die Einführungssammlung von nahe. (Quelle: map.geo.admin.ch)

Der Grund für diese Bachelorarbeit ist der Verdacht, dass ein Teil der Cassispflanzen mit dem Blackcurrant Reversion Virus (BRV) infiziert ist. Der Verdacht beruht vor allem darauf, dass die Ernte mancher Individuen deutlich geringer ausfällt. BRV ist das weitverbreitetste und schlimmste Virus bei *R. nigrum* (Lemmetty & Lehto, 1999). Es kann neben der Minderung der Ernte auch zu einer Veränderung der morphologischen Eigenschaften führen – die Symptome sind in Kapitel 2.1 näher beschrieben. Diese Auswirkungen einer Infektion beeinträchtigen die Erhaltungsarbeit von ProSpecieRara. Ob und welche Pflanzen in den beiden Sammlungen tatsächlich mit BRV infiziert sind, war vor Beginn dieser Arbeit nicht klar. Es ist jedoch so, dass Viruskrankheiten nicht oder kaum im Feld behandelt werden können (siehe dazu Kapitel 3). Das Ziel dieser Arbeit war also, einen Teil der vorhandenen Cassispflanzen auf BRV zu untersuchen und gegebenenfalls virusfrei zu machen. Da die Spätfröste im Frühling 2017 die Pflanzen stark beeinträchtigt hatten und in der nationalen Beerensammlung zu wenig Material für die Probenahme vorhanden war, sollten insgesamt 20 Sorten in der Einführungssammlung untersucht werden.

Daraus folgt die Fragestellung:

1. Sind in der Einführungssammlung von ProSpecieRara Cassis-Pflanzen vorhanden, welche BRV-infiziert sind?
2. Welche Möglichkeiten gibt es, die infizierten Pflanzen virusfrei zu machen? Welche Methoden eignen sich und gelingt die Therapie?
3. Sind die in der Literatur beschriebenen Symptome an den infizierten Pflanzen sichtbar?

2 Das Blackcurrant Reversion Virus und sein Vektor

Das Blackcurrant Reversion Virus (BRV) befällt neben *R. nigrum* einige weitere, aber längst nicht alle *Ribes*-Arten. Wie bereits erwähnt ist es ein sehr wichtiges Virus bei Cassis und kommt in vielen Gebieten vor, wo *R. nigrum* kultiviert wird. BRV löst die Blackcurrant Reversion Disease (kurz: BRD) aus. In der Literatur wird jedoch häufig auch dann die Bezeichnung „BRV“ verwendet, wenn es sich eigentlich um die von ihm ausgelöste Krankheit handelt. Eine häufige Bezeichnung in etwas älterer Literatur ist zudem „Blackcurrant Reversion Associated Virus“ (kurz: BRAV), da lange nicht klar war, ob das Virus tatsächlich die Symptome dieser Krankheit auslöst. Es fehlte die Möglichkeit, diesen Zusammenhang wirklich zu beweisen (Adams & Thresh, 1987; Susi, 2004). Auf Deutsch werden die Bezeichnungen „Reversion bei Cassis“, „Atavismus der Johannisbeere“ und „Brennnesselblättrigkeit der Johannisbeere“ verwendet (Fischer-Colbrie et al., 2015). Die englischen wie deutschen Bezeichnungen weisen darauf hin, dass das Virus eine morphologische Veränderung der Pflanze hervorruft. „Atavismus“ bezeichnet gemäss Bibliographischem Institut (2018a) „das Wiederauftreten von Merkmalen oder Verhaltensweisen, die den unmittelbar vorhergehenden Generationen fehlen“ und „Reversion“ ist eine Umkehrung oder Umdrehung (Bibliographisches Institut GmbH, 2018b). Auf die Symptome wird im Folgenden näher eingegangen.

2.1 Symptome

Bei der Suche nach Symptomen, ist nicht zu vergessen, dass es morphologische Unterschiede zwischen den Sorten gibt. Diese dürfen nicht verwechselt werden mit den Symptomen der BRD!

Die Blätter BRV-infizierter Pflanzen sind schmaler und generell sind weniger Blätter vorhanden als bei gesunden Pflanzen. Sie haben weniger Blattnerven - gemäss Vukovits (2005) zweigen weniger als fünf Nebennerven vom Hauptnerv ab. Die Blätter sind spitzer gezähnt und haben weniger Lappen (Abbildung 4). Daher und aufgrund der schmalere Form kommt auch die Bezeichnung der „Brennnesselblättrigkeit“ zustande.



Abbildung 4: Die Blätter sind weniger gelappt. (Quelle linkes Bild: Lene Carl)

Im Frühling können chlorotische Linien oder ringförmige Flecken auf den Blättern auftreten. Da die Linien und Flecken aber auch Symptome anderer Viruskrankheiten sein können, sind sie nicht diagnostisch (Jones, 2000; Jones et al., 1996). Laut Lemmetty et al. (1997) ist zudem die Blattspreitenbasis weniger gelappt. In der Nationalen Datenbank der Schweiz zur Erhaltung der pflanzengenetischen Ressourcen (2018) sind zur Blattspreitenbasis bei *R. nigrum* die Deskriptoren „geschlossen“, „offen“ und „gerade“ vorhanden. Zwar sind diese nicht explizit auf dieses Symptom bezogen, aber es lässt sich damit gut beschreiben. Abbildung 5 zeigt diese drei Deskriptoren.

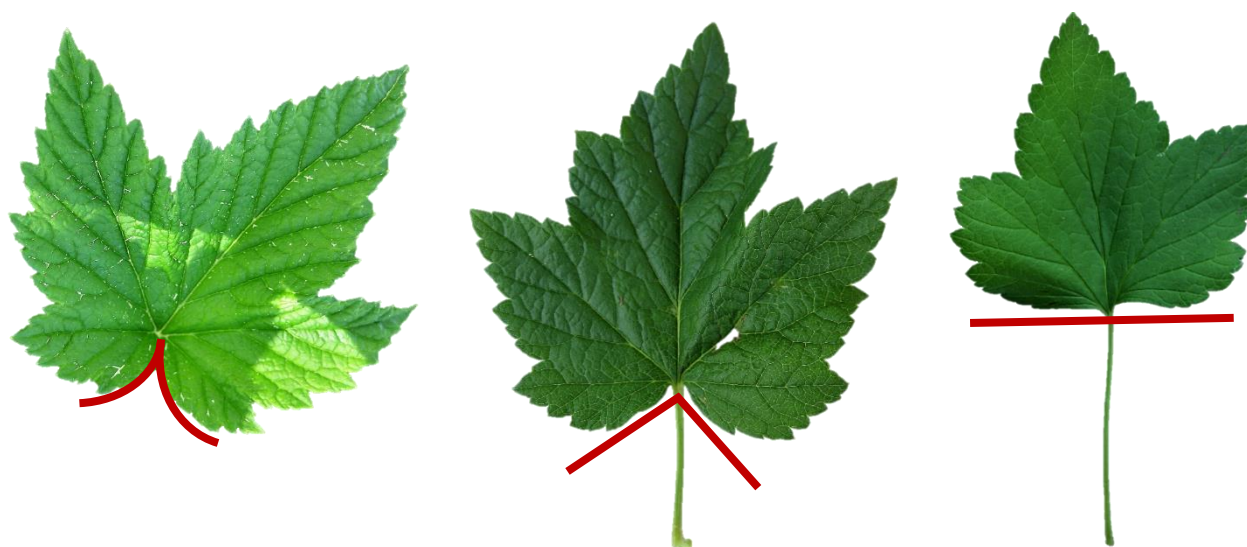


Abbildung 5: Ausprägungen der Blattspreitenbasis. Links: geschlossen. Mitte: offen. Rechts: gerade. Die Blätter mit der geschlossenen und der offenen Blattspreitenbasis sind recht scharf gezähnt.

Die jungen Blütenknospen befallener Pflanzen sind stärker pigmentiert als gesunde und die Flaumhaare sind vermindert oder fehlen ganz. Es kann zudem sein, dass die Staubbeutel fehlen, der Griffel verlängert und eine doppelte Anzahl Blütenblätter vorhanden ist – die Sexualorgane sind also stark beeinträchtigt (vgl. dazu gesunde Blüten in Abbildung 6). In gewissen Fällen sind die Blüten befallener Pflanzen dann steril, was dazu führt, dass die Ernte vermindert wird oder sogar ganz ausfällt. Zudem können die Blütenblätter kleiner sein als normal (Adams & Thresh, 1987; Dolan, MacFarlane, McGavin, Brennan & McNicol, 2011; Fischer-Colbrie et al., 2015).



Abbildung 6: Gesunde Blüten. Links: es ist die einfache Anzahl Kelch- und Blütenblätter vorhanden. Mitte: Staubbeutel sind vorhanden, der Griffel ist nicht verlängert. Rechts: Flaumhaare sind vorhanden.

Die Triebspitzen sind bei befallenen Pflanzen manchmal stärker verzweigt, was zu einem besenartigen Aussehen führt. Auch ist es möglich, dass die neu gebildeten Seitenknospen bereits im Juni/Juli wieder austreiben, was dem Strauch ein buschiges Aussehen verleiht (Jones, 2000; Vukovits, 2005).

Laut Jones et al. (1996) sind die Symptome generell recht variabel und Vukovits (2005) bezeichnet die verminderte Ernte bzw. deren gänzlichen Ausfall als deutlichstes Merkmal für einen Befall durch BRV. Allerdings ist dies nicht diagnostisch, da es zahlreiche andere biotische und abiotische Ursachen dafür geben kann. Es ist aber sicherlich sinnvoll, bei geringer oder ausfallender Ernte die Möglichkeit eines BRV-Befalls in Betracht zu ziehen.

In der Literatur ist häufig von zwei unterschiedlichen Formen von BRV-Symptomen die Rede: Die europäische Form (E-Form) wird charakterisiert durch schwächere bis nicht sichtbare Symptome und ist dementsprechend schwerer erkennbar. Die russische Form (R-Form) zeigt stärkere und mehr Symptome. Fehlende Staubbeutel, verlängerter Griffel, doppelte Anzahl Blütenblätter treten laut Adams & Thresh (1987) nur bei der R-Form auf. Sie kommt in Ländern der ehemaligen Sowjetunion, in Ost- und Mitteleuropa sowie in Skandinavien vor. Auf die beiden Formen wird in Kapitel 2.3 näher eingegangen.

2.2 Diagnose

Aufgrund der grossen Variabilität der Symptome ist eine rein visuelle / morphologische Diagnose an bestehenden Pflanzen nicht einfach. Zudem haben RNA-Tests ergeben, dass das Virus in der Regel sehr unregelmässig über den Strauch verteilt ist. Längst nicht alle Teile der Pflanze sind infiziert. Beispielsweise kann an einem Zweig lediglich eine einzelne infizierte Knospe vorkommen. Tendenziell sind Knospen im Bereich der Zweigspitzen aber eher infiziert, als jene weiter unten. Da es bis zu zwei Jahren dauern kann, bis die Symptome überhaupt sichtbar werden, kann eine Infektion im frühen Stadium auf diese Weise nicht erkannt werden (Adams & Thresh, 1987; Jones et al., 1996).

Eine gängige Diagnosemethode, welche unter anderem von den Behörden des Vereinigten Königreiches und der EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organisation) empfohlen wurde, war folgende: Teile der zu testenden Pflanzen werden auf eine Sorte von *R. nigrum* gepfropft, welche bekannt dafür ist, Symptome einer BRV-Infektion stark zu zeigen. Problematisch dabei ist, dass die Übertragung auf die andere Pflanze nicht mit Sicherheit funktioniert – unter anderem weil die Virus-Konzentration in einem infizierten Pflanzenteil tief sein kann. Zudem ist diese Methode sehr arbeitsintensiv und es muss auf das Erscheinen allfälliger Symptome gewartet werden (Dolan et al., 2011; Latvala et al., 1997).

Ende der 1990er-Jahre sind PT-PCR-Methoden zur Diagnose von BRV aufgekommen. Dolan et al. (2011) haben diese Methoden weiterentwickelt und analysiert, wie zuverlässig sie eine BRV-Infektion diagnostizieren. Sie sind zum Schluss gekommen, dass mittels RNA-Analyse gleich zuverlässig ausgesagt werden kann, ob eine Pflanze mit BRV infiziert ist wie bei der oben beschriebenen Pfropfungs-Methode. Die Vorteile sind aber, dass eine solche RNA-Analyse deutlich schneller vonstattengeht und eine positive Diagnose auch bereits dann gestellt werden kann, wenn an der Pflanze (noch) keine Symptome sichtbar sind. Beiden Methoden ist gemein, dass aufgrund der unregelmässigen Verteilung über die Pflanze die Proben gut über die ganze Pflanze verteilt entnommen werden müssen.

Die PT-PCR-Methode nach Dolan et al. (2011) wurde im Rahmen dieser Arbeit auch auf die untersuchten Pflanzen angewendet.

2.3 Zwei unterschiedliche Formen von BRV?

Trotz der Tatsache, dass in der Literatur sehr häufig zwischen der russischen und der europäischen Form von BRV unterschieden wird, fokussieren sich diese Unterschiede meist auf die morphologischen Erscheinungen bei den Pflanzen und nicht auf das Genom von BRV. Lemmetty et al. (2001) erwähnen die Möglichkeit, dass es verschiedene Virusstämme sein könnten, aber auch einige andere Faktoren der Auslöser sein könnten. Namentlich sind dies die Reaktionen verschiedener Wirtssorten, das jeweilige lokale Klima, unterschiedliche Wachstumsbedingungen sowie weitere biotische und abiotische Faktoren. George & Fox (2014) bringen zudem die Anwesenheit anderer Krankheiten in der Pflanze ins Spiel, welche die phänotypischen Erscheinungen beeinflussen könnte. Přibyllová et al. (2008) untersuchten infizierte Pflanzen unterschiedlicher Herkunft und konnten anhand ihrer Daten keinen Zusammenhang des Genoms mit Herkunft, Wirt, Symptomen und anderen biologischen Charakteristika finden.

Es lässt sich keine Publikation finden, welche bis heute einen direkten Zusammenhang zwischen dem Genom von BRV und den beiden unterschiedlichen Formen gefunden hat.

2.4 Übertragung, Gallmilbe, Bekämpfung

In der für diese Bachelorarbeit verwendeten Literatur wird meist die Johannisbeergallmilbe (*Cecidophyopsis ribis*) als Vektor für BRV genannt (siehe Abbildung 7). Bei genauerer Betrachtung ergibt sich jedoch ein differenzierteres Bild:

Es gibt weitere *Cecidophyopsis*-Arten, welche andere *Ribes*-Arten besiedeln (Susi, 2004) und Lemmetty et al. (2004) gehen davon aus, dass neben *C. ribis* weitere *Cecidophyopsis*-Arten BRV übertragen. Laut Stalažs & Moročko-Bičevska (2016) wurden bisher sieben verschiedene *Cecidophyopsis*-Arten mit *Ribes*-Arten in Verbindung gebracht. Sie sind unterschiedlich stark wirtsspezifisch. In

einer Untersuchung in Lettland sammelten Stalažs & Moročko-Bičevska (2016) Knospen von *R. nigrum*, welche in Pflanzensammlungen, Gärten und wild wuchsen. Sie analysierten die in den Knospen vorkommenden *Cecidophyopsis*-Arten morphologisch (unter dem Mikroskop), molekular und phylogenetisch. Laut ihren Ergebnissen konnten sie keine *C. ribis* finden, jedoch mehrere andere *Cecidophyopsis*-Arten, welche sehr nahe mit *C. ribis* verwandt sind. Auch fanden sie häufig mehrere Arten in einer Knospe. Es ist nicht bekannt, ob die Knospen von BRV-infizierten *R. nigrum* stammten und/oder ob die Milben BRV-infiziert waren. Lemmetty et al. (2004) halten es nach ihren Untersuchungen an Milben von BRV-infizierten *R. nigrum* in Finnland für gut möglich, dass dort der Hauptvektor für BRV bei *R. nigrum* eine andere Milbe, *C. spicata*, ist. Sie fanden auf den untersuchten Pflanzen hauptsächlich *C. spicata* und nur sehr wenige Individuen von *C. ribis*.

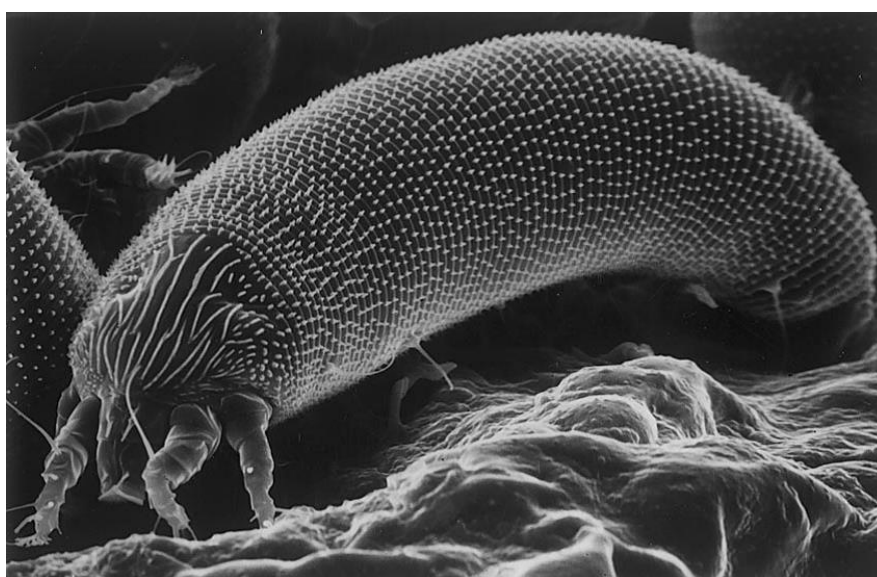


Abbildung 7: Elektronenmikroskop-Aufnahme von *C. ribis*. (Quelle: Jones (2000))

Da sich die verschiedenen *Cecidophyopsis*-Arten nicht nur genetisch, sondern auch morphologisch sehr ähnlich sind und einige Arten lange gar nicht vollständig morphologisch beschrieben waren, vermuten Stalažs & Moročko-Bičevska (2016), dass viele auf *Ribes*-Arten gefundene *C. ribis* in der Vergangenheit fälschlicherweise als solche angesprochen worden sind, auch weil sie - vermutlich aus Unwissen - nicht so genau angeschaut wurden. Es braucht dementsprechend noch viel Forschung, um herauszufinden, welche *Cecidophyopsis*-Arten auf *Ribes*-Arten leben, was ihr Wirtsspektrum ist, und welche Arten tatsächlich BRV übertragen können. Der Übertragungsmodus von BRV sowie die Biologie des Vektors wurden dementsprechend bisher immer in Bezug auf *C. ribis* (vermutlich manchmal auch fälschlicherweise) untersucht. Hierzu trotzdem einige Informationen:

BRV wird durch die Larven, Nymphen und Imagines der Milbe übertragen. Manuell kann es durch vegetative Vermehrung und Pfropfen verbreitet werden. Die Übertragung durch Pfropfen funktioniert

jedoch nicht immer. Noch unwahrscheinlicher ist die Inokulation mit dem Saft infizierter Pflanzen. BRV wird nicht via Samen weitergegeben (Adams & Thresh, 1987; Fischer-Colbrie et al., 2015).

Die Milben überwintern und vermehren sich in den befallenen Knospen und saugen am Vegetationskegel (Fischer-Colbrie et al., 2015; Steinborn, 1982). Die Stoffe, welche durch die Saugtätigkeit ins Gewebe injiziert werden, führen zu Missbildungen an Blättern und Blüten, ihre Anlagen verfallen und wölben sich auf (siehe Abbildung 8) (Focke (1972) in Steinborn (1982)). Dies führt zu den typischen Befallssymptomen von *C. ribis*: Missgestaltete Blätter, geschwollene und unfruchtbare Knospen (siehe Abbildung 8) (Jones, 2000). Die Symptome werden teilweise mit den BRV-Symptomen verwechselt (Adams & Thresh, 1987).

Im Frühling öffnen sich die Knospen, die Milben kriechen hinaus und suchen sich entweder am selben Strauch eine neue Knospe oder werden durch Wind, Regen oder Tiere auf andere Sträucher transportiert (Fischer-Colbrie et al., 2015). Laut Steinborn (1982) werden vor allem die neu gebildeten Knospen in den Blattachsen befallen. Die Überwinterungsknospen können sich aufgrund ihrer Missbildungen häufig gar nicht richtig entfalten und vertrocknen später.

Aus wenigen eierlegenden Weibchen, welche eine Knospe befallen wächst eine Population von bis zu mehreren 10'000 Milben heran. Die Tiere sind winzig – die Weibchen werden ca. 0.25 mm lang (Fischer-Colbrie et al., 2015; Steinborn, 1982).

Längst nicht alle *Cecidophyopsis*-Milben auf *R. nigrum* sind Träger von BRV. Trotzdem ist es gemäss Jones (2000) nicht mehr möglich, die weitere Ausbreitung des Virus oder des Milbenbefalls wirtschaftlich zu bekämpfen, wenn 5-10% der Pflanzen im Bestand mit BRV infiziert bzw. von den Milben befallen sind. Dies zeigt, wie gross der Schaden alleine schon durch *Cecidophyopsis*-Milben sein kann.



Abbildung 8: Links sind gesunde, rechts befallene Knospen abgebildet. Die Verfaltungen sind unten rechts gut sichtbar. (Quelle untere Bilder: Jones (2000))

3 Virusfreimachung

Die Problematik von Viruserkrankungen bei Pflanzen ist, dass es kaum funktioniert, eine Pflanze im Feld zu therapieren, wenn sie einmal infiziert ist (Hu et al., 2017). Laut Bhojwani & Dantu (2013) ist es nicht möglich. Virusbekämpfung muss also immer im Labor oder einer ähnlich kontrollierten Situation stattfinden. Demnach kann eine virusinfizierte Pflanze nur entfernt und durch gesunde Pflanzen ersetzt werden. Für ProSpecieRara ist es jedoch bekanntermassen wichtig, dass die einzelnen Sorten erhalten werden. Es müssen also virusfreie Klone der infizierten Pflanzen erzeugt werden, um diese danach wieder auszupflanzen.

In der Literatur finden sich die unten beschriebenen Methoden für eine Virusfreimachung. Sie werden einzeln oder in unterschiedlichen Kombinationen angewendet. Welche Methode - bzw. welche Kombination von Methoden - die beste ist, kommt auf das Virus, das behandelte Gewebe, die Pflanzenart und die Sorte an (Lassois, Lepoivre, Swennen, van den Houwe & Panis, 2013; Maliogka, Skiada, Eleftheriou & Katis, 2009).

Die **Meristemkultur** ist laut Lassois et al. (2013) die beste Methode, um phloem-assoziierte Viren zu eliminieren. Die Meristemzellen sind noch nicht differenziert und haben dementsprechend noch kein Phloem. In der Regel haben auch die innersten Primordialblätter noch kein Phloem. Für eine Meristemkultur werden dementsprechend am besten das Apikalmeristem und die innersten Primordialblätter genommen (siehe Abbildung 9) – das Meristem alleine heraus zu präparieren ist sehr heikel und fehleranfällig (Smith, 2013). Es gibt allerdings Viren, welche das Meristem befallen können (Faccioli & Marani, 1998). Ob BRV phloem-assoziiert ist und ob es auch das Meristem befällt, lässt sich mittels Literaturrecherchen nicht herausfinden. Viren werden vom Eintrittspunkt ausgehend zuerst von Zelle zu Zelle transportiert und gelangen dann in der Regel ins Phloem für den Ferntransport in der Pflanze (Büttner & Maiss, 2013). Sofern BRV das Meristem nicht befällt und über das Phloem transportiert wird, sollte diese Methode auf BRV-infizierte Pflanzen also anwendbar sein. Faccioli und Marani (1998) bezeichnen die Meristemkultivierung generell als eine gute Methode, um virusfreies Material zu bekommen.

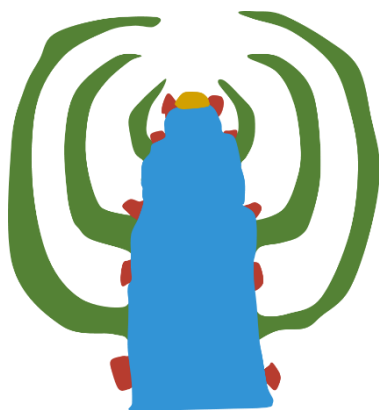


Abbildung 9: Schematische Darstellung einer Knospe. Das Meristem (gelb) ist von Primordialblättchen (grün) umhüllt. Zwischen den Primordialblättchen sitzen Axillarknospen (rot) an der Spindel (blau).

Bei der **Thermotherapie** werden Pflanzen für kürzere (Minuten bis Stunden mit warmem Wasser) oder längere Zeit (mehrere Wochen in der Klimakammer) erhöhten Temperaturen ausgesetzt. Bei der kurzen Variante werden die Viruspartikel beeinträchtigt. Bei der langen Variante wird das Wachstum der Pflanze angeregt. Für eine darauf folgende Meristemkultur sind die Meristeme und Primordialblätter schnell wachsender Triebe am besten geeignet, da die Wahrscheinlichkeit so noch grösser ist, dass sich dort die Leitgefässe noch nicht ausdifferenziert haben und das Virus demzufolge noch nicht bis dorthin gelangt ist (Smith, 2013). Zudem scheint die Thermotherapie auch das Virus selbst zu beeinflussen. Wang et al. (2008) vermuten, dass die Wärme möglicherweise zu RNA-Silencing führt, die Pflanze die virale RNA also unschädlich macht. Des Weiteren soll die Wärme auch die Virus-Replikation hemmen oder stören. Sie bringt das natürliche Gleichgewicht zwischen neu gebildeten und absterbenden Viruspartikeln durcheinander und kann so schlussendlich zu deren Verminderung beitragen (Panattoni, Luvisi & Triolo, 2013; Wang et al., 2008). Ob dies bei allen Viren der Fall ist und wie BRV im Speziellen reagiert, ist nicht bekannt.

Die lange dauernde Thermotherapie wird in vivo (etablierte Pflanzen in Töpfen, bewurzelte Steckhölzer) oder in vitro (auf Meristemkulturen) angewendet. Es folgt darauf häufig noch eine Meristemkultur. Eine andere Möglichkeit ist, die neu gewachsenen Spitzen nach der Thermotherapie auf eine gesunde Unterlage zu pflanzen. Dies ist auch in vitro möglich, wo die Spitze auf einen gesunden Sämling gepfropft wird (Bhojwani & Dantu, 2013; G. Hu et al., 2015; Lassois et al., 2013; Postman, DeNoma & Reed, 2005).

Gemäss Smith et al. (2017) ist Thermotherapie – oft in Kombination mit Meristemkultur – die erfolgreichste Methode um Viren und auch bakterielle Erkrankungen bei Pflanzen zu bekämpfen. Dies ergab sich aus einer Untersuchung von zahlreichen Artikeln zu diesem Thema. Die bei der Thermotherapie angewandten Temperaturen sind je nach Quelle und Pflanzenart unterschiedlich gewählt. Wichtig ist, dass die Pflanze in jedem Fall mit der hohen Temperatur umgehen kann.

Die **Kryotherapie** arbeitet mit extrem tiefen Temperaturen. Triebspitzen werden in Flüssigstickstoff getaucht (-169°C), anschliessend aufgetaut und in-vitro-kultiviert (Bhojwani & Dantu, 2013).

Bei der **Chemotherapie** werden antivirale Chemikalien in das Nährmedium von Meristemkulturen gemischt (Hu, Hong, Wang, Hu & Wang, 2012; Lassois et al., 2013).

Auch die **Regeneration aus Kallusgewebe** kann erfolgreich sein, da Viren in diesem Gewebe sehr unregelmässig verteilt sind und mittels mehrerer Subkulturen gut ausgemerzt werden können (Bhojwani & Dantu, 2013).

Bhojwani & Dantu (2013) erwähnen zudem die **Elektrotherapie**. Diese Methode sei aber noch zu wenig erforscht.

3.1 Das konkrete Vorgehen im Versuch

Es ist nur wenig Literatur zur Virusfreimachung von *R. nigrum* vorhanden. In den wenigen Fällen wurden meist Thermotherapie in vivo und in vitro und/oder Meristemkultivierung angewendet (Campbell, 1965; Sedlák, Paprštejn, Špak, Příbylová & Svobodová, 2011; Wood, 1989). Eine Thermotherapie in vitro wäre zeitlich im Rahmen dieser Arbeit kaum möglich gewesen, da sich die in-vitro-Pflänzchen zuerst etablieren müssen vor der Thermotherapie. Danach wäre erneut Meristem genommen worden und die neuen in-vitro-Pflänzchen hätten sich wieder etablieren müssen, um danach auf Virusfreiheit getestet werden zu können. So bot sich eine in-vivo-Thermotherapie mit nachfolgender Meristemkultur an.

Zur Wärmetoleranz von *R. nigrum* lässt sich in der Literatur wenig finden. Es ist aber allgemein bekannt, dass hohe Temperaturen die Photosynthese und generell die Entwicklung einer Pflanze hemmen können. *R. nigrum* ist, wie in der Einleitung erwähnt, eine Art gemässigter Regionen. Es erträgt somit wohl auch in einer in-vivo-Thermotherapie nicht so hohe Temperaturen wie Arten tropischer Regionen. Hu et al. (2017) beobachteten bei der in-vivo-Thermotherapie von Äpfeln, dass die Knospen durch hohe Temperaturen teilweise gehemmt und somit für die weitere Verwendung unbrauchbar wurden. Campbell (1965) schrieb zudem, dass *Ribes*-Arten hitzeempfindlich sind und besser nicht bei Temperaturen höher als 34°C behandelt werden, dafür über einen längeren Zeitraum.

In verschiedenen Thermotherapie-Versuchen mit Bananen, Äpfeln, *Ribes* und *Rubus* wurden die Pflanzen langsam akklimatisiert, indem sie zuerst über mehrere Wochen bei warmen, aber nicht zu extremen Bedingungen gehalten wurden, um danach die Temperatur schrittweise bis zum Maximum zu erhöhen (G. Hu et al., 2015; Lassois et al., 2013; Wood, 1989). Diese Praxis bietet sich auch für den nachfolgenden Versuch an, da die Steckhölzer Anfangs März geerntet wurden und sich somit an kühle Temperaturen gewohnt waren. Zudem mussten sie zuerst Wurzeln bilden, bevor sie der Thermotherapie ausgesetzt werden konnten.

Cheong et al. (2014), Bhojwani & Dantu (2013) und Lassois et al. (2013) wechseln die Temperaturen in einem Mehrstunden- oder diurnalen Rhythmus. Die tiefere Temperatur soll die therapierten Pflanzen etwas entlasten. Bei Lassois et al. (2013) geht die tiefere Temperatur einher mit einer Dunkelperiode. Die Methode des Temperaturwechsels wurde im vorliegenden Versuch nicht angewendet.

Bei der in-vitro-Thermotherapie zeigen längere Therapiedauern und höhere Temperaturen bessere Viruseliminierungsraten. Bei höheren Temperaturen sinkt jedoch die Überlebensrate (G. Hu et al., 2015; Lizárraga, Ascasíbar & González, 2017). Im nachfolgenden Versuch wird deshalb eine längere Thermotherapie mit moderaten Temperaturen durchgeführt.

Für die Rezeptur der Nährmedien besteht ein Artikel von Dziedzic & Jagła (2013). Sie basiert auf älteren Artikeln zur Meristemkultivierung von *Ribes* und *Rubus* und wurde im vorliegenden Versuch leicht abgeändert verwendet.

4 Material und Methoden

4.1 Zeitplan

In Tabelle 1 ist der zeitliche Ablauf des ganzen Versuchsteils aufgelistet.

Tabelle 1: zeitlicher Ablauf des praktischen Teils

02.03.2018	Probenentnahme in der Einführungssammlung
08.03.2018	Präparieren der Proben für die Molekulare Analyse sowie der Steckhölzer
09.03.2018	Stecken der Steckhölzer, Start Bewurzelung
16.03.2018	Transfer in die Klimakammer, Fortsetzen der Bewurzelung
19.04.2018	Start Thermotherapie Phase I
02.05.2018	Start Thermotherapie Phase II
23.05.2018	Start Thermotherapie Phase III
31.05.2018	Start Thermotherapie Phase IV
11.06.2018	Start Meristemkultur auf Initiationsmedium
09.07.2018	Transfer auf Multiplikationsmedium
13.08.2018	Transfer auf Bewurzelungsmedium

4.2 Schnitt des Pflanzenmaterials in der Sammlung

Material

Gerätschaften
Gartenschere
Zeitungspapier
Plastiksäcke

Methoden

Die erste Probenentnahme erfolgte am 02.03.2018 in der Einführungssammlung in Riehen (Abbildung 10). Im Rahmen des Winterschnitts wurden von jeder beprobten Pflanze so viele Ruten wie möglich bodennah geschnitten, ohne dass die Pflanze dadurch einen Schaden erlitt. Die Anzahl bewegte sich zwischen 8 und 15 Ruten pro Pflanze. Dabei wurde darauf geachtet, die Ruten gleichmässig über die Pflanze verteilt zu schneiden, um der unregelmässigen Verteilung von BRV gerecht zu werden. Die Ruten wurden in feuchte Zeitungen und Plastik eingewickelt und für 6 Tage im Kühler bei ca. 5 °C, ohne Licht bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Es wurden insgesamt 20 Pflanzen (von 20 Sorten je eine Pflanze) beprobt. Die Liste der beprobten Pflanzen findet sich in Anhang I.



Abbildung 10: Die Einführungssammlung und ein einzelner Strauch zum Zeitpunkt der ersten Probenentnahme am 02.03.2018

Da während der Thermotheapie der Grossteil der Steckhölzer abgestorben war (Details siehe in den Kapiteln Resultate und Diskussion), wurde für die Meristemkultivierung zusätzliches Pflanzenmaterial von den Mutterpflanzen benötigt. Es wurde Material von BE-470 und BE-790 geschnitten. Beide waren in der molekularen Analyse positiv auf BRV getestet worden, eine trug zudem ein neues Closterovirus in sich. Dabei wurden von jeder Pflanze ca. 10 diesjährige Jungtriebe geschnitten, wiederum gut über die Pflanze verteilt.

Die Triebe wurden in feuchtes Zeitungspapier und Plastik eingewickelt transportiert und anschliessend über Nacht in Leitungswasser eingestellt.

4.3 Probenvorbereitung und Präparation der Steckhölzer

Material

Chemikalien	Gerätschaften
MENNO Florades 4%	Gartenschere 6 geeignete Ruten pro Pflanze Massstab Zip-Beutel

Methoden

Die Steckhölzer und die Proben für die molekulare Analyse wurden am 08.03.2018 präpariert. Die Gartenschere wurde für jede Pflanze neu mit MENNO Florades 4% desinfiziert.

1. Von jeder beprobten Pflanze die 6 bestgeeigneten Ruten auswählen (Abbildung 11). Eignungskriterien sind: lange einjährige Triebe, bleistift dick (war meistens nicht möglich), gesund (keine Rundknospen durch *C. ribis* o.ä., kein Stachelbeermehltau, keine Schildläuse). Entsprechen zu wenige Ruten den Kriterien, dann die nächstbesten auswählen und befallene Teile entfernen.
2. Zuschnitt: von den sechs Ruten je drei Spitzen für die molekulare Analyse und je drei Spitzen als Steckhölzer zuschneiden. Dasselbe gilt für die darunterliegenden Teile der Rute. Von einer Rute, deren Spitze für die molekulare Analyse zugeschnitten wird, den darunterliegenden Teil als Steckholz verwenden und umgekehrt (siehe Abbildung 12 & Abbildung 13).
 - a. Für die molekulare Analyse: von jeder Rute 10 cm verwenden. Bei der Spitze wird ab unterhalb der Terminalknospe gemessen, bei den darunterliegenden Teilen sind es genau 10 cm. Nodien und Internodien werden nicht beachtet. Die sechs Stücke jeder Pflanze in einem Zip-Beutel sammeln.
 - b. für die Steckhölzer: von der Spitze die Terminal- und evtl. die oberste Lateralknospe entfernen. Über der nächsten Lateralknospe gut 1 cm stehen lassen, um Rücktrockschäden zu vermeiden. Für Steckhölzer aus dem unteren Teil, ein allfällig zu lange überstehendes Internodium ebenfalls bis auf gut 1 cm oberhalb der nächsten Lateralknospe zurückschneiden. Ab der Lateralknospe jeweils mindestens 15 cm nach unten messen und knapp unterhalb einer Knospe schneiden. Je nach Internodienlänge kann ein Steckholz auch ca. 20 cm lang werden. Die sechs Steckhölzer jeder Pflanze sorgfältig zusammenbündeln.



Abbildung 11: Die Ruten von BE-898 vor und nach der Auswahl der Bestgeeigneten.

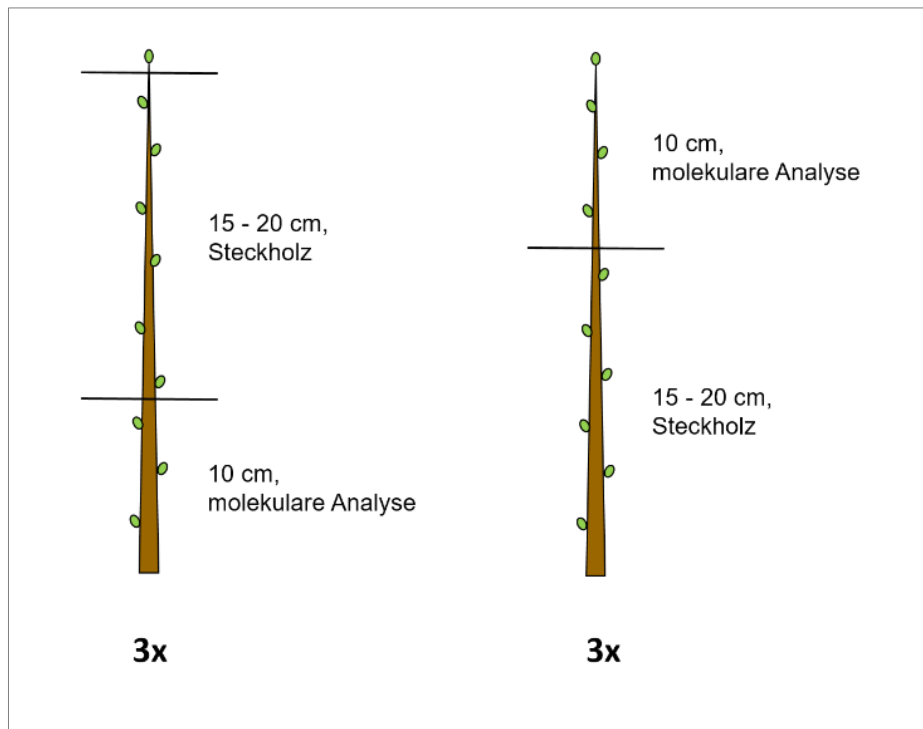


Abbildung 12: Schema für das Zuschneiden der Steckhölzer und der Proben für die Analyse pro beprobte Pflanze



Abbildung 13: Fertig zugeschnittene Proben für die Molekularanalyse (links) und Steckhölzer (rechts)

4.4 Molekulare Analyse

Die molekulare Analyse wurde von der Agroscope Changins am 20.03.2018 durchgeführt. Die Proben wurden mittels RT-PCR (BRV10F/R) nach Dolan et al. (2011) auf BRV getestet. Zusätzlich erfolgte auf Eigeninitiative von Jean-Sébastien Reynard (Agroscope Changins) mittels ELISA die Beprobung auf ein neues Closterovirus, welches bereits bei Weinreben beobachtet wurde.

4.5 Präparation der Steckhölzer & Bewurzelung

Material

Chemikalien etc.	Gerätschaften
Envidor Leitungswasser IBA-Pulver 2% Floradur® Block Bio	Plastikkessel Blumenmesser Plastiktöpfe Soparco 11.5 x 11.5 x 21.5 cm (2l)

Methoden

Vorbereitung der Steckhölzer:

Um allfällig vorhandene Johannisbeergallmilben auf den Steckhölzern zu bekämpfen, wurden diese für 2.5 h in Envidor 0.04% eingelegt, danach abgetropft und über Nacht mit Plastik bedeckt und im Kühler dunkel bei ca. 5 °C aufbewahrt.

Am Folgetag wurden die Steckhölzer mit einem Blumenmesser im untersten Viertel bis auf das Kambium angeritzt. Dies erfolgte gegenüber einer Knospe auf einer Länge von ca. 3 cm. Anschliessend wurde das untere Ende mit Pulver von 2%iger 3-indolylbuttersäure (IBA) benetzt (Abbildung 14). Das Stecken erfolgte jeweils zu zweit in Rosentöpfe mit Floradur® Block Bio Substrat, so dass das ganze Steckholz bis auf eine Knospe im Substrat steckte (Abbildung 15). Die Steckhölzer wurden mit Leitungswasser angegossen.

Zusätzlich wurden einige Teststeckhölzer gesteckt, um im Laufe der Bewurzelung den Fortschritt verfolgen zu können.

Bewurzelung:

Der erste Teil der Bewurzelung erfolgte im Warmhaus bei ca. 25 °C und ca. 70% rH im Dunkeln (schwarzes Bändchengewebe). Gegossen wurde nach Bedarf.

Nach einer Woche wurden die Töpfe in eine Standard Wachstumskammer (SGC 120, Fitotron) transferiert. Dort wurden sie während fünf Wochen bei 10°C, 70% rH, Lichtdauer 6d/18n gehalten und nach Bedarf gegossen. Allfällige Blüten wurden entfernt, um die anderen Pflanzenteile zu fördern.



Abbildung 14: Angeritztes (oben) und anschliessend mit Hormonpulver benetztes (unten) Steckholz.



Abbildung 15: Die Steckhölzer wurden jeweils zu zweit in einen Topf gesteckt.

4.6 Thermotherapie

Material

Chemikalien	Gerätschaften
WUXAL NeemAzal-T/S Solbac	Birchmeier-Spritze Giesskanne Sprayflasche USB EasyLog Data Logger & iButton Logger (für Temperatur und relative Luftfeuchtigkeit)

Methoden

Die Thermotherapie erfolgte in der Standard Wachstumskammer (SGC 120, Fitotron). Die Steckhölzer wurden weiterhin nach Bedarf gegossen und Blüten entfernt. Gedüngt wurde via Blatt mit WUXAL 0.05%. Trauermücken wurden regelmässig mit NeemAzal-T/S und 2x Solbac bekämpft. NeemAzal-T/S ist offiziell nicht für die Bekämpfung von Trauermücken deklariert, Erfahrungswerte von Gaby Gottschalk (IUNR) und Andermatt Biocontrol zeigen aber, dass es auch bei Trauermücken wirkt und generell als Insektizid eingesetzt werden kann (mündliche Mitteilung von G. Gottschalk).

Die Thermotherapie war in vier Phasen unterteilt. Die Temperatur wurde schrittweise erhöht, um den Pflanzen eine langsame Anpassung zu ermöglichen. Zudem wurde die Temperatur als Zwischenschritt für drei Wochen auf 24°C belassen – ebenfalls aus Gründen der Anpassung - bevor die Temperatur erneut schrittweise gesteigert wurde. Der genaue Ablauf findet sich in Tabelle 2. Die relative Luftfeuchtigkeit schwankte zwischen 60 und 70% bei einer Lichtdauer von 16d/8n.

Tabelle 2: Die vier Schritte der Thermotherapie (* gemessene Temperaturen je nach Loggertyp → USB / iButton), siehe auch in Anhang II)

Phase	Dauer	Temperaturverlauf
I	13 Tage (19.04. – 02.05.2018)	Erhöhung der Temperatur um 2°C alle 2 Tage. Von 10 auf 24°C / 25°C*
II	21 Tage (02.05. – 23.05.2018)	konstante Temperatur von 24°C / 25°C*
III	8 Tage (23.05. – 31.05.2018)	Erhöhung der Temperatur um 2°C alle 2 Tage. Von 24°C / 25°C* auf 34°C / 34.5°C*
IV	12 Tage (31.05. – 11.06.2018)	konstante Temperatur von 34°C / 34.5°C*

Aufgrund von Messungenauigkeiten der Sensoren in der Wachstumskammer in Bezug auf Temperatur und Luftfeuchtigkeit stellte das Einstellen der beiden Parameter eine Herausforderung dar. Um trotzdem möglichst genau zu sein, wurden sie mittels zusätzlichen Loggern überwacht und ggf. angepasst. Der genaue Temperaturverlauf ist in Anhang II zu finden.

4.7 In-vitro-Kultivierung

Für die Meristemkultivierung konnten aus Zeitgründen nur zwei Sorten verwendet werden. Dies waren die Sorte *Schwarze Johannisbeere von Orpund* (BE-470) und die Sorte *Schwarze Traube* (BE-790). Beide sind positiv auf BRV getestet worden, BE-790 ist zudem mit einem neuen Closterovirus infiziert (siehe Kapitel Resultate). Von BE-470 überlebte ein Steckholz die Thermotheapie, wovon 8 Meristeme gewonnen werden konnte. Zusätzlich wurden von den diesjährigen Jungtrieben aus dem zweiten Schnitt (BE-470 & BE-790) je 40 Meristeme aus den Blattachselknospen gewonnen. Zwar empfehlen Dziedzic & Jagła (2013), 100 Meristeme pro Sorte zu nehmen, darauf musste jedoch – ebenfalls aus Zeitgründen – verzichtet werden. Meristem wird nach einer in-vivo-Thermotheapie entweder aus den Sprossspitzen oder den neu gebildeten Axillarknospen gewonnen (z.B. in Hu et al., 2017; Reynard & Spring, 2013; Wang et al., 2008). Da bei der Gewinnung aus Axillarknospen deutlich mehr Meristem pro Trieb entnommen werden kann, als aus den Sprossspitzen, wurde diese Methode angewendet.

4.7.1 Nährmedien

Material

Chemikalien etc.	Gerätschaften
1 oder 2 L Wasser deionisiert Standardmischung MS / WPM Hormonlösungen BA, IBA, GA ₃ , IAA Saccharose Agar HCl & NaOH (pH-Einstellung)	1-2 Schottflaschen à 1 L Magnetrührer Waage Polylöffel Autoklav Petrischalen Ø 9 cm oder in-vitro-Becher Parafilm bzw. Deckel für in-vitro-Becher Messpipetten pH-Messgerät Ethanol 70% zur Desinfektion.

Methoden

Die Herstellung der Nährmedien basiert auf der Rezeptur von Dziedzic & Jagła (2013). Für das Initiations- und das Multiplikationsmedium wurden jedoch 36.7 mg L⁻¹ statt 73.4 mg L⁻¹ FeNa-EDTA, 0.1 mg L⁻¹ statt 0.5 mg L⁻¹ Thiamin HCl und 7000 mg L⁻¹ Agar statt 6000 mg L⁻¹ verwendet. Es basiert auf dem *Murashige & Skoog medium including vitamins (M0222)* von Duchefa Biochemie (2018a). Das Bewurzelungsmedium basiert auf dem *McCown Woody Plant medium (M0219)* von Duchefa Biochemie (2018b). Es wurden ebenfalls 36.7 mg L⁻¹ statt 73.4 mg L⁻¹ FeNa-EDTA und 7000 mg L⁻¹ Agar statt 6000 mg L⁻¹ verwendet. Da aus Versehen das Medium ohne Vitamine bestellt wurde, fehlten die Vitamine (Glycin, Myo-Inositol, Nicotinsäure, Pyridoxin HCl, Thiamin HCl) gänzlich.

Die genauen Rezepturen sind in Anhang III zu finden.

Es wurden drei unterschiedliche Nährmedien hergestellt: Für die Initiation, für die Multiplikation und für die Bewurzelung. Vom Initiationsmedium 1 L, von den beiden anderen jeweils 2 L. Die Vorbereitung der unterschiedlichen Medien fand jeweils ca. eine Woche vor deren erster Verwendung statt.

1. Schottflasche(n) bis ca. 2/3 mit deionisiertem Wasser füllen
2. Unter ständigem Rühren (Magnetrührer) 4.406 g L⁻¹ Standardmischung MS bzw. 2.463 g L⁻¹ WPM, Saccharose und Hormone begeben, auffüllen mit deionisiertem Wasser auf 1 L.
3. pH messen und gegebenenfalls mit HCl und NaOH auf pH 5.7 einstellen.
4. Agar beifügen.
5. Medium in der Schottflasche autoklavieren (121°C, ca. 210 kPa), danach in Petrischalen (für Initiationsmedium) bzw. in-vitro-Becher (Multiplikations- und Bewurzelungsmedium) ausgegossen und diese verschliessen. Aufbewahrung möglichst steril.

4.7.2 Präparation der Meristeme

Material

Chemikalien etc.	Gerätschaften
NaOCl 4.5% Tween Ethanol 70% Wasser deionisiert & sterilisiert	Schere 4 x Becherglas 250 ml Stereolupe Glasperlensterilisator Skalpell Pinzette Initiationsmedium in Petrischalen Parafilm Bench mit laminarem Luftstrom

Methoden

Bei der Präparation wurden das thermotherapierte Steckholz und die nicht-therapierten diesjährigen Triebe gleich behandelt, es wurden die neu gebildeten Axillarknospen verwendet. Um das Meristem herum wurden noch einige Primordialblättchen belassen, um das Meristem nicht zu verletzen. Im Folgenden wird für das Meristem mit den Primordialblättchen die Bezeichnung in-vitro-Pflänzchen verwendet.

Vorbereitung:

1. Blätter sorgfältig abzupfen, ohne die Knospen in den Blattachseln zu verletzen (Abbildung 16).
2. Steckholz / Triebe in Stücke schneiden. Dabei jeweils ca. 0.5 cm ober- und unterhalb des Nodiums schneiden, um die Knospe nicht zu verletzen
3. In einem Becherglas 100 ml NaOCl 4.5% mit 1 Tropfen Tween (Netzmittel) mischen, Stücke 2 Min. darin schwenken, abseihen.
4. Stücke 2 min. in Ethanol 70% schwenken (Becherglas), abseihen
5. Stücke 2 x 2 min in deionisiertem und sterilisiertem Wasser schwenken. Nach dem zweiten Mal nicht ganz abseihen, um ein Austrocknen der Stücke zu vermeiden.

Zuschneiden (unter der Stereolupe):

1. Knospe oberhalb der Blattnarbe vom zugeschnittenen Stück abtrennen (Abbildung 17, links)
2. Knospenschuppen und einige Blattanlagen einzeln mittels Pinzette und Skalpell entfernen (Abbildung 17, Mitte)
3. Den nun nackten Teil der Achse abtrennen (Abbildung 17, rechts)
4. Verbleibende Knospe (=in-vitro-Pflänzchen) aufrecht auf Nährmedium platzieren (10 Stück pro Petrischale), Petrischale sauber verschliessen.



Abbildung 16: links oben: Knospe mit Blatt, links unten: Knospe ohne Blatt. Rechts: Knospe ohne Blatt, die Blattnarbe ist deutlich sichtbar.



Abbildung 17: Links: Vom Stück abgeschnittene Knospe mit Knospenschuppen und Blattanlagen. Mitte: Knospe mit teilweise nackter Achse. Rechts: Knospe, bei welcher die nackte Achse bereits abgetrennt wurde. Die gelblichen Punkte sind Harzdrüsen.

4.7.3 Passagieren der in-vitro-Pflänzchen

Material

Chemikalien etc.	Gerätschaften
Nährmedium (vorbereitet) Ethanol 70%	Pinzetten Glasperlensterilisator Medium in Petrischalen bzw. in-vitro-Bechern Ggf. Becherglas Ggf. Parafilm für Petrischalen Bench mit laminarem Luftstrom

Methoden

Nach 4 Wochen wurden die in-vitro-Pflänzchen vom Initiations- auf das Multiplikationsmedium passagiert – jeweils 5 Stück pro in-vitro-Becher. Nach weiteren 5 Wochen wurden sie auf das Bewurzelungsmedium übertragen.

In pilzbefallenen Petrischalen oder in-vitro-Bechern wurden die befallenen In-vitro-Pflänzchen (Abbildung 18, rechts) regelmässig entfernt und die gesunden auf frisches Medium desselben Typs bzw. bei gegebenem Zeitpunkt auf das neue Medium passagiert. In-vitro-Pflänzchen mit Bakterienbefall (Abbildung 18, links) wurden für ca. 2 Min. in Ethanol 70% geschwenkt, die schleimige Schicht entfernt und auf ein frisches Medium desselben Typs passagiert – getrennt von den nicht befallenen Individuen ihrer Schale. Abgestorbene in-vitro-Pflänzchen wurden entfernt. In-vitro-Pflänzchen, bei welchen sich Seitentriebe gebildet hatten, wurden auseinandergenommen und die Triebe einzeln auf dem Medium platziert. Beim Passagieren auf das Bewurzelungsmedium wurde zudem das braune Gewebe soweit wie möglich abgeschabt.

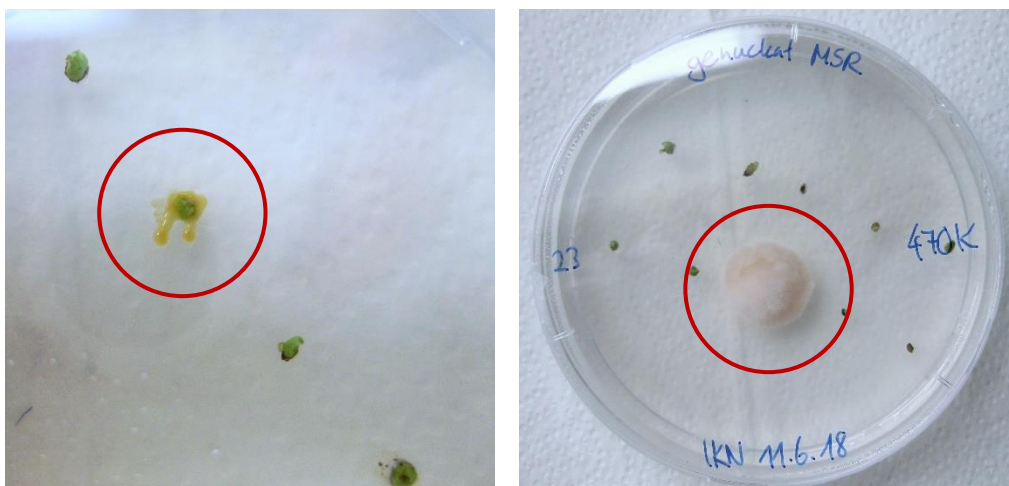


Abbildung 18: Bakterienbefallene in-vitro-Pflänzchen (links) wurden in Ethanol gewaschen und danach passagiert. Pilzbefallene in-vitro-Pflänzchen (rechts) wurden entfernt.

4.8 Ergänzende morphologische Beschreibung

Ergänzend zur molekularen Analyse I wurden die morphologischen Merkmale der Pflanzen in situ betrachtet. Bei der Ernte der Steckhölzer und der Proben für die Molekularanalyse am 02.03.2018 wurde auf die allgemeine Form des Strauches sowie auf allfällige Rundknospen, welche durch die Milbe hervorgerufen werden können, geachtet – dies geschah bei allen beprobten Pflanzen. Bei den darauffolgenden Untersuchungen wurden nur noch jene vier Pflanzen betrachtet, welche positiv auf BRV getestet worden sind (BE-108, BE-470, BE-648, BE-790). Dies geschah aus Zeitgründen. Ergänzend dazu wurde die Sorte *Schwarze Johannisbeere von Osogna* (BE-526) angeschaut, welche weder mit BRV noch mit dem neuen Closterovirus infiziert war. Am 24.04.2018 lag der Fokus auf den Blüten und bereits vorhandenen grösseren Blättern. Sie wurden fotografiert und es wurde nach allfälligen Symptomen Ausschau gehalten. Bei den Blättern, dem Strauch als Ganzes und den beinahe reifen Früchte war es am 10.06.2018 dasselbe Vorgehen. In der Nationalen Datenbank der Schweiz zur Erhaltung der pflanzengenetischen Ressourcen (2018) wurden zudem die einzelnen Einträge zu den untersuchten Akzessionen nach allfälligen Symptomen durchsucht.

5 Resultate

5.1 Virusfreimachung

5.1.1 Molekulare Analyse

In der molekularen Analyse wurden 4 der 20 beprobten Pflanzen positiv auf BRV getestet. Zusätzlich waren 8 Pflanzen mit dem neuen Closterovirus infiziert, wobei BE-108 und BE-790 mit beiden Viren infiziert sind. 10 Pflanzen zeigten keine Infektion. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Ergebnisse der molekularen Analyse I

Datum: 20.03.2018		Getestete Viren	
		Closterovirus	BRV
BE-Nr.	Sortenname	Elisa	RT-PCR (BRV10F/R)
103	Silvergieters	-	-
108	Schwarze Johannisbeere aus dem Autal	positiv	positiv
217	Mendip Cross	positiv	-
218	Noir de Bourgogne	positiv	-
219	Roodknop	positiv	-
220	Rosenthals Langtraubige	-	-
308	Schwarze Johannisbeere von Wattwil	positiv	-
390	Schwarze Johannisbeere von Gretzenbach	positiv	-
455	Boskoop Giant	-	-
470	Schwarze Johannisbeere von Orpund	-	positiv
505	Schwarze Johannisbeere von Bevaix	-	-
526	Schwarze Johannisbeere von Osogna	-	-
609	Schwarze Johannisbeere von Le Brassus	-	-
611	Schwarze Johannisbeere von Schönried	-	-
613	Schwarze Johannisbeere von Chardonne	positiv	-
648	Westwick Choice	-	positiv
790	Schwarze Traube	positiv	positiv
898	Schwarze Johannisbeere von Lettland (Wildform)	-	-
911	Titania	-	-
938	Tenah	-	-

5.1.2 Bewurzelung und Thermotherapie

In Woche 1 in Dunkelheit und Wärme brachen die oberirdischen Knospen rasch auf und begannen auszutreiben. Die Triebe hatten eine blasse grün-gelbe Farbe. Durch das Licht im Klimaschrank nahmen sie innerhalb weniger Tage das normale Blattgrün an (Abbildung 19). Das Wachstum verlangsamte sich im Verhältnis zum Warmhaus.



Abbildung 19: Links & Mitte (15.03.2018): Die Steckhölzer trieben rasch aus und nahmen eine blasse Farbe an. Rechts (21.03.2018): im Klimaschrank wurden sie rasch grün.

Bei ausgegrabenen Test-Steckhölzern konnten – mehrheitlich in der unteren Hälfte - erste Wurzel-Ansätze festgestellt werden. Zuerst waren dies nur kleine Erhebungen, später verlängerten sich diese zu kurzen Wurzeln. Es zeigten sich an den auf das Kambium angeritzten und mit Hormonpulver benetzten Stellen keine Unterschiede zum Rest der unteren Hälfte (Abbildung 20).



Abbildung 20: Links (28.03.2018): Erste Wurzelansätze. Mitte & Rechts (04.04.2018): Verlängerte Wurzelansätze. Der Bereich des angeritzten Kambiums ist mit einem roten Pfeil markiert.

Der Befall von Trauermücken im Klimaschrank konnte mit NeemAzal-T/S und Solbac nicht vollständig bekämpft werden.

Die meisten Steckhölzer trieben aus; meist aus der obersten Knospe, teilweise auch aus der zweitobersten Knospe. Sie bildeten Blätter und teilweise Blüten (siehe Abbildung 21). Die Blüten wurden jedoch entfernt.



Abbildung 21: Erfolgreich ausgetriebene Knospen (13.04.2018). Im mittleren Bild ist eine Blüte sichtbar.

Ab Woche 8 traten Probleme auf: Es zeigten sich Blattrandnekrosen und der Blattrand rollte sich teilweise ein. Die Blätter zeigten vereinzelt gelbe, stark verschwommene Flecken und Interkostalchlorosen. Einige ältere Blätter zeigten zudem gelbe Nerven oder gelbe Ränder. Nach und nach welkten sehr viele Blätter und starben schlussendlich ab. Dabei machten die jüngsten Blättchen noch am längsten einen vitalen Eindruck – sie welkten und vertrockneten jedoch ebenfalls (Abbildung 22 & Abbildung 23). So starben nach und nach fast alle Steckhölzer ab. Am Ende der Thermotheapie lebten nur noch eines der Steckhölzer von BE-470 sowie einige Test-Steckhölzer (Abbildung 24).

Nach der Thermotheapie wurden die unterirdischen Teile der Steckhölzer bonitiert. Die abgestorbenen Steckhölzer hatten keine Wurzeln, sondern Löcher an der Stelle, wo vermutlich Wurzeln gewesen waren. Die Rinde liess sich leicht ablösen. Darunter lebten häufig Trauermückenlarven. Das Mark war oftmals nicht mehr vorhanden oder verschimmelt (Abbildung 25). Die überlebenden Steckhölzer, hatten Wurzeln in der oberen Hälfte. Diese waren lang und kräftig. Bei zwei der fünf überlebenden Steckhölzern setzten die Wurzeln direkt unterhalb des oberirdischen Triebes an (Abbildung 26).



Abbildung 22: Stand 29.04.2018. Links: Der Austrieb ist verwelkt und vertrocknet. Mitte: der Blattrand der hinteren Blätter begann sich einzurollen. Rechts: Gesunder Austrieb.



Abbildung 23: Stand 04.05.2018. Links: Gänzlich vertrocknete Knospe. Mitte: Verschwommene gelbe Flecken. Rechts: Auch grössere Austriebe verwelkten.



Abbildung 24: Stand 28.05.2018. Nur ein Steckholz von BE-470 (links) und einige Test-Steckhölzer (Beispiel, rechts) überlebten die Thermotheapie.



Abbildung 25: Der Unterirdische Teil der abgestorbenen Steckhölzer. Links: Löcher anstelle der Wurzeln. Mitte: Trauermückenlarve unter der Rinde. Rechts: Es war kein Mark mehr vorhanden.



Abbildung 26: Überlebende Steckhölzer. Sie hatten Wurzeln direkt unterhalb des oberirdischen Triebes oder verteilt über die ganze obere Hälfte.

5.1.3 In-vitro-Kultivierung

Viele in-vitro-Pflänzchen begannen sich auf dem Medium nach kurzer Zeit zu öffnen und erste Blättchen entwickelten sich. Auf den Bildern vom 09.07.2018 ist zu sehen, dass die in-vitro-Pflänzchen des thermotherapierten Steckholzes (BE-470) schneller und mehr Blättchen bildeten als die Varianten BE-470 und BE-790 ohne Thermotherapie. Dies glich sich über die Kulturzeit aber aus. Jener Teil der in-vitro-Pflänzchen, welcher mit dem Medium in Berührung kam, wurde braun. Nicht alle in-vitro-Pflänzchen trieben aus. Manche wurden direkt braun und trocken, andere waren noch länger grün, veränderten ihre Grösse und Form aber nicht (Abbildung 27). Zudem entwickelten sich um manche herum Pilzrasen oder ein Bakterienfilm.

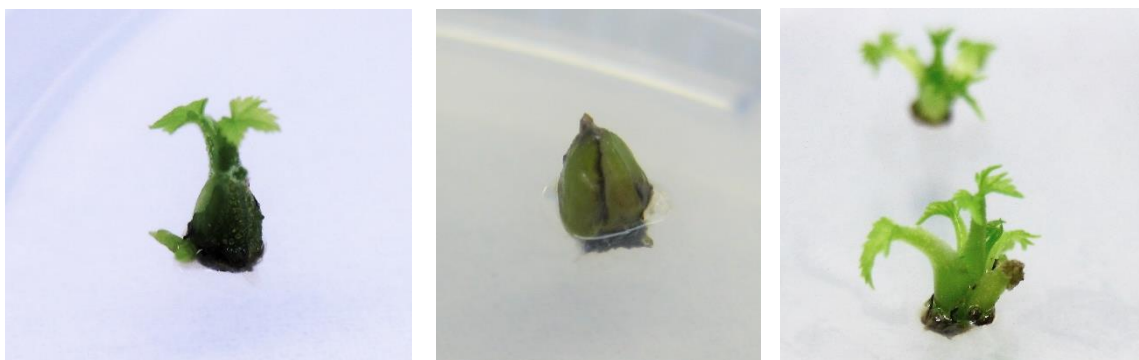


Abbildung 27: Stand 09.07.2018. Links & Mitte: Ausgetriebenes und nicht ausgetriebenes in-vitro-Pflänzchen von BE-790. Rechts: in-vitro-Pflänzchen des thermotherapierten BE-470. Die braunen unteren Bereiche sind im rechten Bild am besten sichtbar.

Mit der Zeit wurden in-vitro-Pflänzchen, welche zwar nicht ausgetrieben hatten, aber grün geblieben waren, ebenfalls braun. Beim Sezieren am 02.08.2018 zeigten sich keine lebenden Teile mehr. Das innere Gewebe war weich, das äussere braun und ledrig. Der Raum zwischen den Blattanlagen mit Bakterien Schleim durchsetzt (Abbildung 28).

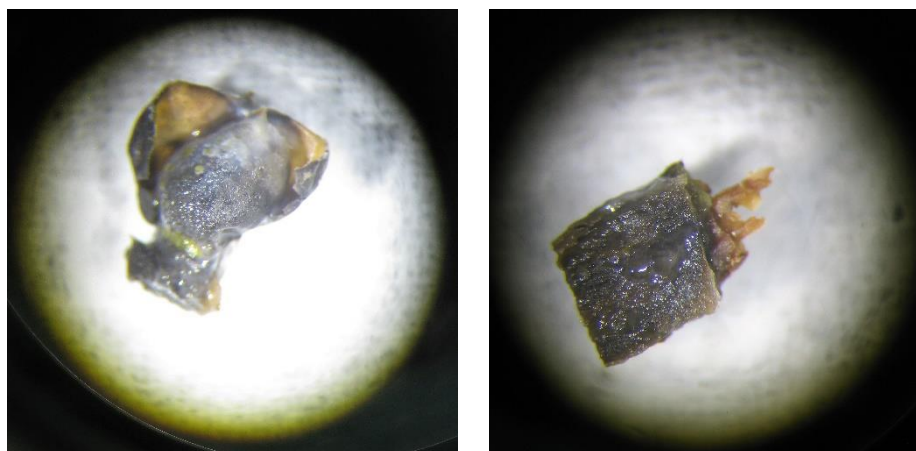


Abbildung 28: Abgestorbene in-vitro-Pflänzchen am 02.08.2018. Links: Ledrige Knospschuppen mit Bakterien Schleim. Rechts: Der innere, weiche Teil.

Viele in-vitro-Pflänzchen, welche zu Beginn gut ausgetrieben hatten, zeigten später kaum mehr eine Entwicklung. Sie blieben grün, wuchsen aber nicht weiter. Falls sich neue Triebe bildeten, wuchsen diese sehr langsam. Der Grossteil starb nach und nach ebenfalls ab. Häufig waren die äusseren Blättchen noch grün, die inneren Blättchen und der Vegetationskegel aber bräunlich, weich und schleimig, vergleichbar mit jenen in-vitro-Pflänzchen, welche sich nicht geöffnet hatten. Beim Sezieren wurde zwischen den noch lebenden, aneinander liegenden Blättchen zweimal ein lebendes Insekt gefunden.

Bis zum Passagieren auf das Bewurzelungsmedium (13.08.2018) hatten sich noch keine Wurzeln gebildet. Die dunkle, feste Schicht, welche bereits am 09.07.2018 hatte beobachtet werden können, hatte sich verstärkt (dunkelbraun, korkartig) und zeigte sich auch an anderen Pflanzenteilen. Auf Bildern vom 25.08.2018 ist dies gut sichtbar. Der Teil, welcher mit dem Medium in Berührung gekommen war, zeigte bei fast allen Pflänzchen diese Veränderung. Das dunkle Gewebe war bröckelig und liess sich leicht abschaben. Darunter war bei den meisten Pflänzchen normales, grünes Gewebe. Im Querschnitt eines abgestorbenen Pflänzchens war der ganze unterste Teil braun, jedoch nur die äussere Schicht korkartig verdickt (Abbildung 29). Teilweise zeigten auch die Blättchen eine solche Veränderung. Das Gewebe war nicht bröckelig, jedoch dunkelbraun und häufig ledrig verdickt. Meist wanderte die Veränderung im Blättchen von unten nach oben. Bei einzelnen Blättchen zeigte sich die Veränderung nur punktuell (Abbildung 30). Eine Blattspitze, welche über längere Zeit mit dem Medium in Berührung gekommen war, war ebenfalls dunkelbraun und ledrig.

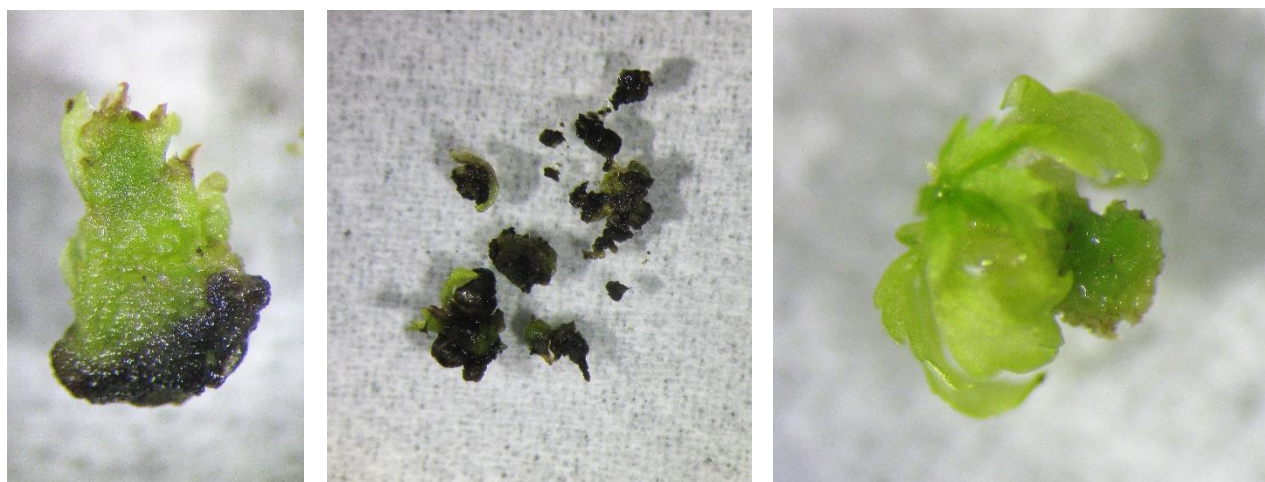


Abbildung 29: Stand 25.08.2018. Links: Nur die äusserste Schicht des braunen Teils ist ledrig. Der obere Teil ist noch grün, die Blättchen allerdings abgestorben. Mitte: Abgeschabte, bröckelige Schicht. Rechts: Lebendes in-vitro-Pflänzchen nach dem Abschaben der Schicht.

In der Zeit um den Transfer auf das Bewurzelungsmedium kam es im Gewebekulturraum zu mehreren Ausfällen der Klimaanlage. Da die Aussentemperaturen in dieser Zeit sehr warm waren, stieg die Temperatur im Raum zwischenzeitlich mehrere Male bis auf 33°C. In dieser Zeit entwickelten sich um einen Grossteil der verbliebenen Pflänzchen herum Pilzrasen.

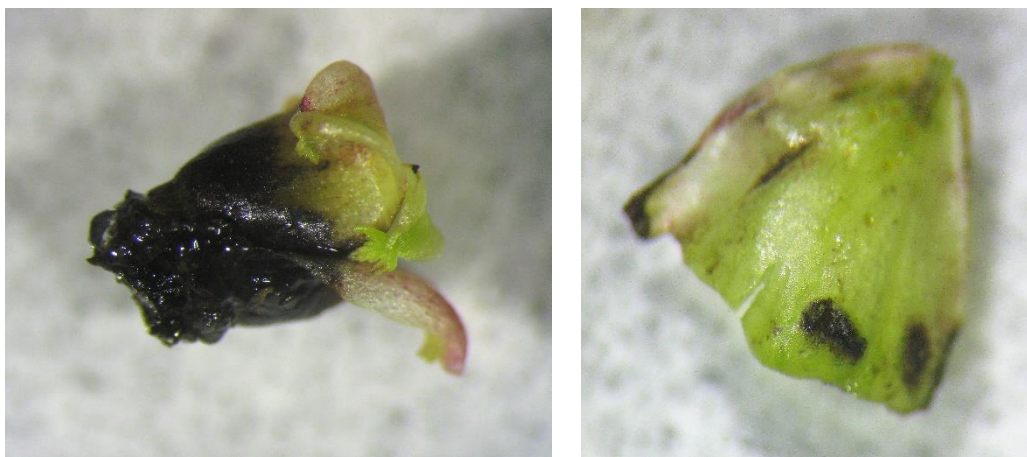


Abbildung 30: Stand 25.08.2018. Links: Ledrige Verdickung an den Blättchen. Rechts: Punktuelle Veränderung an einem abgebrochenen Blatteil.

Beim Sezieren eines abgestorbenen Pflänzchens zeigten sich im inneren Teil winzige helle, von Auge kaum sichtbare, lebende, Tiere. Unter dem Mikroskop betrachtet wiesen sie Ähnlichkeiten mit *C. ribis* und den ihr ähnlichen *Cecidophyopsis*-Arten auf. Da die Bilder unter dem Mikroskop erst einige Tage später gemacht werden konnten, vertrockneten die Milben zwischen Objektträger und Deckglas trotz sorgfältiger Aufbewahrung und wurden dadurch verformt (siehe Abbildung 31). Von ungeübtem Auge können diese Milben nicht sicher bestimmt werden - vor allem nicht auf Art. Es ist jedoch ein interessanter Fund!

Bis zum 06.09.2018 hatten sich bei keinem Pflänzchen Wurzeln gebildet. Als bei den noch verbliebenen Pflänzchen das korkartige Gewebe entfernt wurde, zerfielen sie in mehrere kleine Teilpflänzchen, welche sich bei mehreren In-vitro-Pflänzchen gebildet hatten. Diese wurden dann einzeln auf das Medium platziert. Davon überlebte bis am 20.09.2018 aber nur eines. Dieses war nur ca. 5mm lang. Gemäss Jean-Sébastien Reynard (Agroscope Changins) braucht es für die RNA-Analyse jedoch mindestens 1g Pflanzenmaterial. Dementsprechend konnte die geplante zweite Molekularanalyse nicht durchgeführt werden. Ob die angewandte Kombination aus Thermotherapie und Meristemkultivierung wirkungsvoll ist, bleibt also unklar.

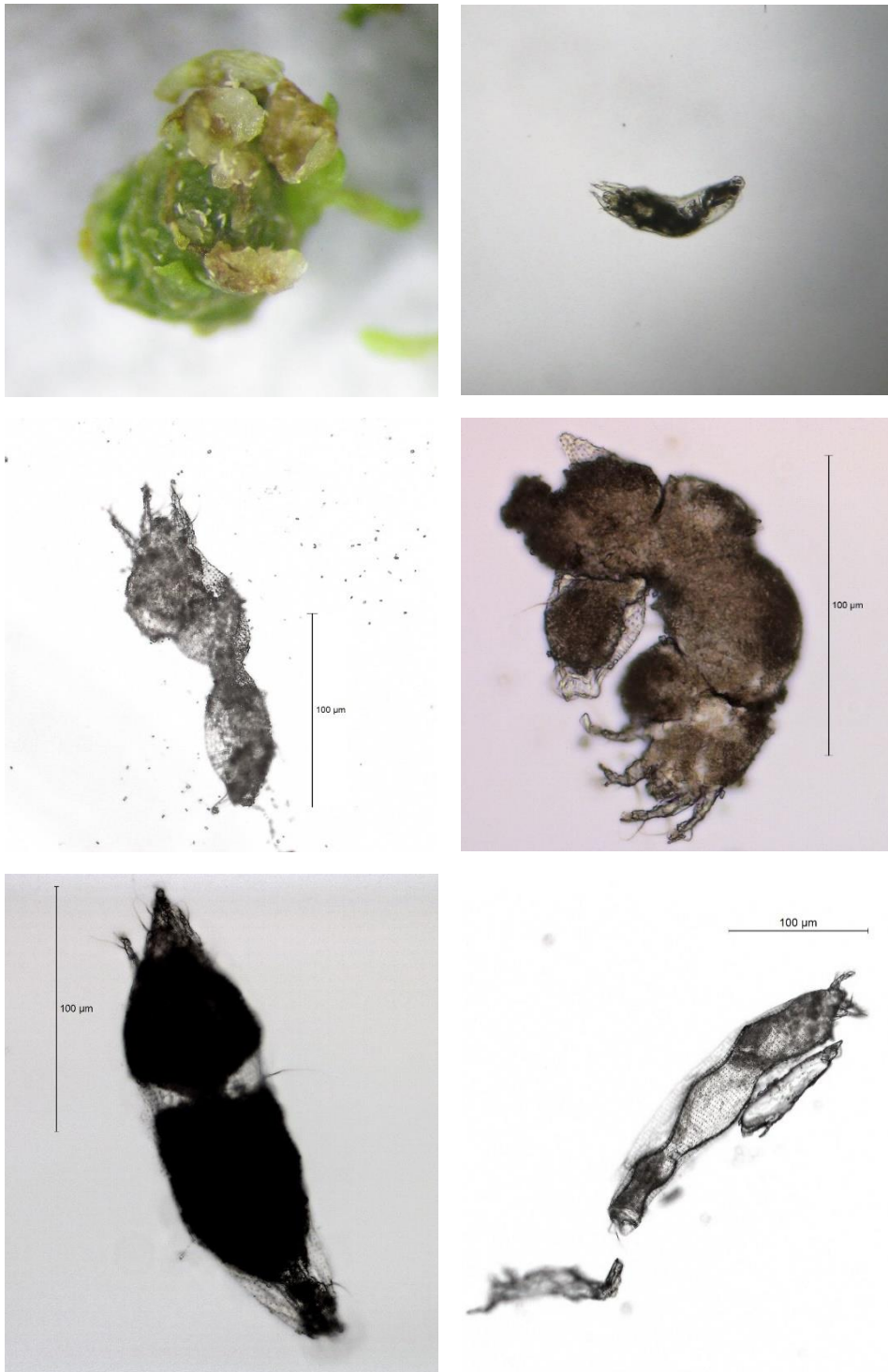


Abbildung 31: Oben links: Milben auf dem in-vitro-Pflänzchen. Alle anderen Bilder sind Aufnahmen aus dem Mikroskop. Der schwarze Balken ist jeweils 100 µm lang.

5.2 Ergänzende Morphologische Beschreibung

Die beobachteten Symptome sind nach Pflanzenteil gegliedert. Hinzu kommen die Beobachtungen am ganzen Strauch, welche bei der Ernte der Steckhölzer und der Proben für die Molekularanalyse gemacht wurden. Diese werden ergänzt durch Beobachtungen von Martin Frei, welche er zu früheren Zeitpunkten gemacht hat. Daten aus der Nationalen Datenbank der Schweiz zur Erhaltung der pflanzengenetischen Ressourcen (Bundesamt für Landwirtschaft, 2018) sind in einer separaten Tabelle enthalten.

5.2.1 Pflanzen im frühen Frühling (02.03.2018) & frühere Beobachtungen

Tabelle 4 enthält die Beobachtungen vom 02.03.2018, sowie frühere Beobachtungen von M. Frei. Siehe dazu auch Abbildung 32

Tabelle 4: Beobachtungen vom 02.03.2018, sowie frühere Beobachtungen von Martin Frei

BE-Nr.	Bemerkung
103	Knospen teilweise leicht aufgeblasen, aber keine klassischen Anzeichen für die Milbe. Milbe evtl. vorhanden.
108	-
217	Einzelne aufgeblasenen Knospen vorhanden, eindeutig durch die Milbe ausgelöst.
218	-
219	Pflanze recht schwach
220	Teilweise stark geschwollene Knospen, Milbe vorhanden
308	-
390	Verdacht auf BRV, Pflanzen recht verwachsen, wenig Material vorhanden
455	Teilweise leicht aufgeblasene Knospen, aber keine klassischen Anzeichen für die Milbe. Milbe evtl. vorhanden.
470	Verdacht auf BRV
505	Einige Knospen ziemlich sicher mit Milbe (aufgeblasen). Verdacht auf BRV (Verrieseln, kleine Beeren, kein Ertrag mehr)
526	Teilweise geschwollene Knospen, Milbe vorhanden
609	-
611	-
613	-
648	-
790	Milbe vorhanden, aufgeblasene Knospen vorhanden.
898	Milbe vorhanden, ist eine Wildform → erinnert an Reversion
911	Milbe vorhanden
938	Vereinzelt aufgeblasene Knospen, Milbe vorhanden. Pflanze recht schwach

5.2.2 Blüten (24.04.2018)

Tabelle 5 enthält die Beschreibung von morphologischen Blüteneigenschaften, welche am 24.04.2018 untersucht wurden. Es konnten keine Symptome beobachtet werden (siehe auch Abbildung 33).

Tabelle 5: Morphologische Eigenschaften der Blüten am 24.04.2018

BE-Nr.	Bemerkung
108	Blütenorgane normal Flaumhaare vorhanden
470	Blütenorgane normal Flaumhaare vorhanden
526	Blütenorgane normal Flaumhaare vorhanden
648	Blütenorgane normal Flaumhaare vorhanden
790	Blütenorgane normal Flaumhaare vorhanden



Abbildung 32: Geschwollene Knospen von BE-220 (links) und BE-505 (rechts)



Abbildung 33: Normale Blütenorgane (einfache Anzahl Kelch- und Blütenblätter, Staubbeutel vorhanden, Griffel nicht verlängert). Auf dem rechten Bild sind Flaumhaare sichtbar.

5.2.3 Blätter & Triebe (24.04.2018 & 10.06.2018)

Tabelle 6 enthält die Beschreibung von morphologischen Blatt- und Triebeigenschaften vom 24.04.2018 und 10.06.2018. Die verschiedenen Symptome sind in Abbildung 34 zu sehen.

Tabelle 6: Morphologische Eigenschaften der Blätter und Triebe am 24.04.2018 und 10.06.2018

BE-Nr.	Bemerkung
108	<p>24.04.2018 Vereinzelt Blätter mit spitzeren Zähnen vereinzelte Blätter mit weniger Lappen oder asymmetrisch Blattbasis teilweise beinahe gerade, ansonsten meist offen. Vereinzelt geschlossen.</p> <p>10.06.2018 Blattbasis offen. Zähne teilweise rundlich, teilweise spitziger, aber nicht übermässig spitzig. Vereinzelt nur drei deutliche Lappen Neu gebildete Knospen treiben nicht aus</p>
470	<p>24.04.2018 Blattspreitenbasis mehrheitlich offen, teilweise beinahe gerade.</p> <p>10.06.2018 Blattspreitenbasis offen – sehr offen, vereinzelt gerade. Gerades Blatt mit weniger Blattspreitenlappen. Vereinzelt treiben neu gebildete Knospen wieder aus</p>
526	<p>24.04.2018 Blattbasis offen, vereinzelt geschlossen</p> <p>10.06.2018 Blattbasis meist offen, teilweise geschlossen oder gerade. Neu gebildete Knospen treiben nicht aus</p>
648	<p>24.04.2018 Blattbasis mehrheitlich offen, teilweise beinahe gerade.</p> <p>10.06.2018 Blattspreitenbasis offen – gerade. teilweise ziemlich spitze Zähne Keine neugebildeten Knospen gesehen, welche austrieben</p>
790	<p>24.04.2018 Blattbasis offen – beinahe gerade vereinzelte spitzer gezähnte Blätter vereinzelte weniger Lappen</p> <p>10.06.2018 Blattspreitenbasis offen – gerade (meist nur beinahe gerade) vereinzelte weniger Lappen Wieder austreibende Knospen in den Blattachsen vorhanden.</p>

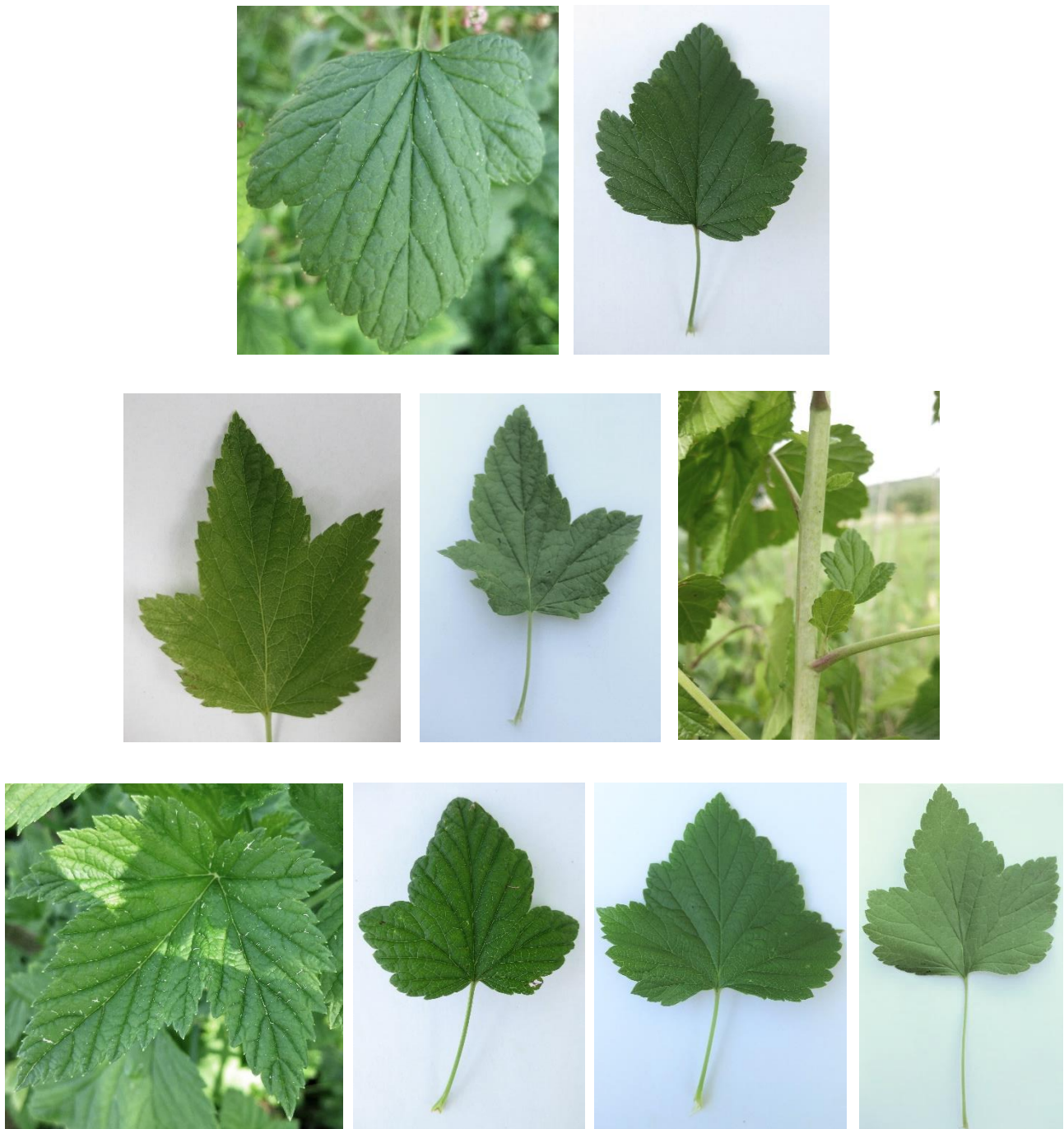


Abbildung 34:

Oben: Die Blätter sind asymmetrisch und haben weniger Lappen als normal.

Mitte: Auf dem linken und dem mittleren Bild sind Blätter mit stark gesägten Zähnen. Das rechte Bild zeigt eine Blattachselknospe, welche im Juni bereits wieder austrieb.

Unten: Die verschiedene Ausprägungen der Blattspreitenbasis von geschlossen (links) zu gerade (rechts).

5.2.4 Früchte (10.06.2018)

In Tabelle 7 sind Bemerkungen zu den Früchten enthalten. In Abbildung 35 sind typische Bilder dazu.

Tabelle 7: Einige morphologische Eigenschaften der Früchte

BE-Nr.	Bemerkung
108	Kaum Trauben vorhanden. Nur wenige Beeren an der Grappe.
470	Nur wenige Beeren an der Grappe.
526	Viele Beeren an den Trauben (an den meisten Stielen hängt auch eine Beere)
648	Mehr Früchte, als 108, 470 & 790, aber weniger als 526.
790	Nur sehr wenige Früchte an den Grappen



Abbildung 35: : Je eine Grappe mit typischer Menge an Fruchtbehang. V.l.n.r.: BE-526, BE-108, BE-790, BE-648, BE-470

5.2.5 Informationen aus der Nationalen Datenbank

In Tabelle 8 sind Informationen aus der Nationalen Datenbank Schweiz (2018) zusammengestellt, namentlich jene über die Ertragsfähigkeit, die Grappendichte, die Blattspreitenbasis und die Neigung zum Verrieseln. Wurden in einem Jahr mehrere Einträge verfasst, so sind sie alle enthalten. In der Datenbank sind nur Einträge bis ins Jahr 2015 vorhanden.

Tabelle 8: Informationen aus der Nationalen Datenbank.

BE-Nr.	Ertragsfähigkeit	Grappendichte	Blattspreitenbasis	Neigung zum Verrieseln	Jahr
108			geschlossen		2011
		mittel			2012
		mittel	geschlossen		2014
			offen		2014
	mittel	mittel	offen	mittel	2015
		locker	geschlossen		2015
470		locker	offen		2011
			geschlossen		2011
		locker			2011
		locker			2012
			offen		2013
		mittel			2014
			geschlossen		2014
	gering	locker	geschlossen	mittel	2015
	mittel	locker	offen	stark	2015
			geschlossen		2015
526		mittel		stark	2011
		mittel			2011
			geschlossen		2013
			geschlossen		2014
		dicht			2014
	hoch	locker	geschlossen	mittel	2015
	hoch	mittel	geschlossen		2015
		locker			2015
		mittel			2015
648			offen		2010
			offen		2011
			geschlossen		2011
		mittel	geschlossen		2014
		mittel	offen		2014
			offen		2015

BE-Nr.	Ertragsfähigkeit	Grappensdichte	Blattspreitenbasis	Neigung zum Verrieseln	Jahr
790			gerade		2010
		locker			2011
			offen		2011
		mittel			2013
			gerade		2013
		mittel	offen		2014
			gerade		2014
	gering	locker	gerade	mittel	2015
			offen		2015

6 Diskussion

6.1 Bewurzelung & Thermotherapie

Der Grossteil der Steckhölzer ist vermutlich aufgrund der Trauermückenlarven gestorben, welche die bereits entwickelten Wurzeln durch Frass stark beschädigt haben. Ob es noch andere Probleme gab, ist aufgrund der dominanten Auswirkung des Wurzelfrasses unklar. Wieso einige Steckhölzer überlebt haben und lange Wurzeln ausbilden konnten, ist nicht klar, denn sie wurden gleich behandelt wie alle anderen. Für die Etablierung der Steckhölzer ist die Wurzelentwicklung essentiell, da sie nur zu Beginn das Wasser und die Nährstoffe aus dem Substrat ohne Wurzeln nutzen können. Dementsprechend wichtig ist es, das Problem mit den Trauermücken besser zu kontrollieren. Im vergangenen Versuch konnten zwar die Adulttiere mittels NeemAzal-T/S einigermaßen kontrolliert werden, jedoch verblieben genügend Tiere, um ständig neue Eier zu legen und die Larvenpopulation aufrecht zu erhalten. Solbac wurde während der Zeit in der Klimakammer nur zwei Mal angewendet, was zu selten war. Die Bekämpfung müsste in einem allfälligen weiteren Versuch besser geregelt werden: Gegen die Adulttiere empfiehlt sich wieder NeemAzal-T/S, es können auch Klebefallen eingesetzt werden. Solbac gegen die Larven sollte öfters eingesetzt werden. Andermatt Biocontrol (2018) bietet zudem die Raubmilbe *Hypoaspis miles* an, welche Eier und Larven im Substrat fressen. Auch Traunem (insektenparasitische Nematoden) ist eine Möglichkeit.

Die überlebenden Steckhölzer zeigten keine negativen Reaktionen auf die erhöhten Temperaturen. Es kann davon ausgegangen werden, dass *Ribes nigrum* gut über eine längere Zeit bei ca. 34°C überleben kann. In einem weiteren Versuch könnte die Temperatur etwas mehr gesteigert werden. Es ist anzunehmen, dass die Viruseliminierungsrate leicht höher wäre, wenn die Methode funktioniert.

Aufgrund der Tatsache, dass die überlebenden Steckhölzer am Ende nur in der oberen Hälfte Wurzeln hatten, stellt sich die Frage, ob das Anritzen des Kambiums und das Benetzen mit Hormonpulver nötige Arbeitsschritte sind.

In mehreren Publikationen (z.B. G. Hu et al., 2015) wurden für die in-vivo-Thermotherapie etablierte Pflanzen verwendet, die seit 2-3 Jahren in einem Topf wuchsen. Diese Pflanzen sind insgesamt grösser und haben ein besser ausgebildetes Wurzelsystem. Sie können sich während der Thermotherapie besser mit Wasser und Nährstoffen versorgen und sind weniger anfällig auf Trauermückenlarven. Es ist eine Überlegung wert, die Steckhölzer im Freiland in Töpfen oder im Boden zu etablieren. Dort sind die Trauermücken weniger präsent. Nachteilig wäre dabei, dass die Lebensbedingungen schlechter kontrolliert werden können. Bei einem Befall mit *Cecidophyopsis*-Arten, ist die Bekämpfung schwieriger als bei Steckhölzern.

6.2 In-vitro-Kultivierung

6.2.1 Zeitpunkt und Art der Meristemgewinnung

Wie im Teil Material und Methoden erwähnt, musste zwei Mal Knospenmaterial für die in-vitro-Kultivierung gewonnen werden, weil der Grossteil der Steckhölzer die Thermotherapie nicht überlebt hatte. Bei den während der Thermotherapie gebildeten Axillarknospen ist die Wahrscheinlichkeit gross, dass die Meristeme virusfrei sind. Bei den Axillarknospen, welche von den diesjährigen Trieben der in-situ-Pflanzen gewonnen wurden, ist dies nicht gegeben. Der Fund von Milben in zwei abgestorbenen in-vitro-Pflänzchen zeigt, dass die Axillarknospen im Juni bereits von Milben befallen sein können. Es ist nicht sicher, ob die gefundenen Milben der Gattung *Cecidophyopsis* angehören, aber die Möglichkeit besteht. Die *Cecidophyopsis*-Milben kriechen wie bereits erwähnt beim Austrieb aus ihren Überwinterungsknospen auf neu gebildete Knospen, um sich darin zu vermehren. Vom Aussehen her haben sich diese Knospen zum Zeitpunkt der Meristemgewinnung (noch) nicht von den anderen Knospen unterschieden und beim Präparieren unter der Stereolupe sind keine Milben aufgefallen. Wahrscheinlich waren die Milben zu diesem Zeitpunkt noch zu wenig lange in der Knospe, als dass ihre Saugtätigkeit bereits zu einer Formveränderung hätte führen können. Zudem waren es noch wenige Tiere, da sie am Anfang der Populationsgründung standen und sie befanden sie sich vermutlich ganz im Innern der Knospe. Es ist möglich, dass dieser Befall ausreichte, um das in-vitro-Pflänzchen mit BRV zu infizieren. Es kann davon ausgegangen werden, dass die beiden Knospen nicht die einzigen mit Milben befallenen waren. Nicht jedes abgestorbene in-vitro-Pflänzchen wurde detailliert untersucht. Das Ernten von Knospen im Frühsommer ist also nicht zu empfehlen. Das Ernten von Steckhölzern für die Thermotherapie im frühen Frühling müsste hingegen praktikabel sein. Es muss darauf geachtet werden, dass sie vor dem Aufbrechen der Knospen geerntet werden - bevor die Milben aus befallenen Knospen kriechen. Die Rundknospen müssen entfernt und die Steckhölzer mit einem Akarizid behandelt werden.

Falls das Material für die in-vitro-Kultur im Frühsommer gewonnen werden muss, könnte das Meristem von der Sprossspitze genommen werden. In der verwendeten Literatur (siehe Kapitel 2.4) wird nur beschrieben, dass die Milben die neu gebildeten Knospen befallen. Ob die aktiv wachsenden Triebspitzen von Milben befallen sein können, ist nicht erwähnt.

6.2.2 Befall durch Mikroorganismen

Der Pilz- und Bakterienbefall waren während der Mikrokultivierung ein grosses Problem. Die Kontaminationen hätten durch die vorgängige Desinfektion der Nodien-Stücke stark vermindert werden sollen. Allerdings erreicht diese Desinfektion nur die äussersten Schichten. Mikroorganismen können auch in Ritzen, zwischen den Primordialblättchen, sowie endophytisch in Gefässsystem oder Zellzwischenräumen leben (Miyazaki, Tan & Errington, 2010; Smith, 2013). Es wird empfohlen, die

zu desinfizierenden Stücke in warmem Wasser zu waschen und dabei gut zu schütteln oder zu rühren, damit sich oberflächige Kontaminationen besser lösen (Smith, 2013). Bei *R. nigrum* hat es auf der Oberfläche der Knospenschuppen und Primordialblättchen Harzdrüsen, auf welchen Mikroorganismen kleben bleiben können. Diese Harzdrüsen lassen sich beim Waschen relativ schlecht lösen. Von der Oberfläche können beim Präparieren Mikroorganismen auf die inneren Organe übertragen werden. Eine Option ist, die fertig präparierten In-vitro-Pflänzchen noch einmal sorgfältig zu desinfizieren.

Dieses Vorgehen hilft nicht gegen endophytische Mikroorganismen. In der Regel können phloem-assoziierte Mikroorganismen durch Meristemkultivierung gut entfernt werden (Cassells & Tahmatsidou, 1997). Im vorliegenden Versuch wurden aber mehrere Primordialblättchen um das Meristem herum belassen, weil die Gefahr der Meristemverletzung als zu gross eingestuft wurde. Es sollte probiert werden, in einem nächsten Versuch noch weniger Primordialblättchen zu belassen. Es kann sein, dass die Thermotherapie auch auf (endophytische) Bakterien und Pilze einen Einfluss hatte. Es wurde während der Mikrokultivierung nicht beobachtet, ob die thermotherapierten in-vitro-Pflänzchen einen geringeren Pilz- und Bakterienbefall zeigten als die anderen.

Laut Smith (2013) ist aktiv wachsendes Material (Triebspitzen) und solches aus dem Gewächshaus in der Regel weniger kontaminiert. Wenn möglich kann bei einer nächsten Durchführung auf solches Material zurückgegriffen werden. Es ist möglich, dass die in vitro-Pflänzchen aus der Thermotherapie rein durch den geschützten Rahmen während des Austriebes weniger kontaminiert waren.

Wieso sich der Pilzbefall während dem Ausfall der Klimaanlage so stark steigerte ist unklar. Möglicherweise waren es Pilze, welche tendenziell thermophil sind und bei den erhöhten Temperaturen deutlich besser wachsen konnten.

6.2.3 Korkgewebe

Das Phänomen, welches in den Resultaten als Korkgewebe bezeichnet worden ist, ist vermutlich durch die Oxidation von Phenolen ausgelöst worden. Bei vielen verholzenden Pflanzen treten an verletzten Stellen Phenole aus. Diese Phenole oxidieren und dadurch werden Medium und Gewebe braun bis fast schwarz (Faccioli & Marani, 1998; McCown, 2000). Ob die bröckelige und lederige Konsistenz an Teilen der gebräunten Gewebe nur durch diese entstanden ist, oder ob es noch andere Gründe gibt, ist unklar. Möglicherweise hat sich an den durch das Präparieren verletzten Stellen Kallus gebildet als Wundreaktion. Das Kallusgewebe kann ebenfalls durch die oxidierten Phenole gebräunt worden sein und diese Struktur gebildet haben.

Laut Ahmad et al. (2013) hemmen die oxidierten Polyphenole das Zellwachstum und somit das Wachstum der in-vitro-Pflänzchen, was bis zum Absterben führen kann. Tao et al. (2007) vermuten, dass sie im Gewebe die Enzymaktivitäten unterdrücken und es so vergiften. Die hemmende Wirkung

kann erklären, wieso ein Grossteil der in-vitro-Pflänzchen nach dem anfänglichen Austreiben nur noch langsam gewachsen ist. Hinzu kommt, dass sich Mikrokulturen verholzender Pflanzen teilweise deutlich langsamer entwickeln und so mehr Zeit brauchen, sich zu etablieren (McCown, 2013).

Schäden durch Polyphenoloxidation können folgendermassen verhindert werden:

- Regelmässiges Passagieren in der Anfangszeit – das frische Medium ist frei von Oxidationsprodukten (Faccioli & Marani, 1998).
- Die Kultur zu Beginn im Dunkeln halten. Laut Adams (1972) und George & Sherrington (1984) sind die für die Oxidation verantwortlichen Enzyme dann weniger aktiv.
- Der Einsatz von Antioxidantien (häufig Ascorbinsäure) auf verschiedene Arten:
 - i. Meristeme/In-vitro-Pflänzchen vor der Inkulturnahme in einem Antioxidans schwenken (Titov, Bhowmik, Mandal, Alam & Uddin, 2006)
 - ii. Antioxidans in (Ahmad et al., 2013) oder auf (Ko, Su, Chen & Chao, 2009) das Medium geben. Ascorbinsäure sollte nach dem Autoklavieren zum Medium gegeben werden, da sie sonst keine Wirkung zeigt.
- Es können Absorber wie Aktivkohle in das Medium gegeben werden – diese absorbieren aber auch Pflanzenhormone etc., was nicht erwünscht ist (Ahmad et al., 2013).

6.2.4 Medienrezeptur

Die Rezepturen der Nährmedien nach Dziedzic & Jagła (2013) und Duchefa Biochemie (2018a, 2018b) unterscheiden sich in einzelnen Punkten, obwohl sie sich gemäss eigenen Angaben beide auf die jeweiligen Originalquellen beziehen. Die Originalversion konnte nur für das MS-Medium (Murashige & Skoog, 1962) gefunden werden – das andere ist weder digital noch in Buchform verfügbar.

Die Vergleiche sind in Anhang IV zu finden. Zwar wurde für den Versuch aus Versehen das Woody Plant Medium OHNE Vitamine genommen (Duchefa Biochemie, 2018b), zum Vergleich der Medienrezepturen wurde aber die Zusammensetzung jener Mischung MIT Vitaminen genommen (Duchefa Biochemie, 2018c), da dieses das richtige gewesen wäre. Aus dem Artikel von Dziedzic & Jagła (2013) und der Website von Duchefa Biochemie (2018a, 2018b, 2018c) geht nicht hervor, aus welchen Gründen die Anpassungen vorgenommen wurden. Bei Dziedzic & Jagła (2013) handelt es sich möglicherweise um Anpassungen an die Bedürfnisse von *Ribes spp.*. Gemäss McCown (2013) ist das MS-Medium für viele verholzende Pflanzen nicht geeignet. Es enthält im Gegensatz zu anderen (Standard-)Medien eine grosse Menge anorganischer Salze (Smith, 2013). Ob *R. nigrum* empfindlich auf MS-Medium reagiert, konnte mittels Literatur nicht herausgefunden werden. Generell stellt sich aber die Frage, ob Standardmedien geeignet sind, um auf so viele unterschiedliche Pflanzenarten angewendet zu werden. Pflanzen haben in der Regel unterschiedliche Ansprüche an

die Mengen von Nährstoffen sowie deren Verhältnisse zueinander. Bei einer Wiederholung dieses Versuches sollten die Nährstoffbedürfnisse von *R. nigrum* ausführlich recherchiert werden.

Welche Auswirkungen die fehlenden Vitamine auf die zu bewurzelnden In-vitro-Pflänzchen hatten, lässt sich schwer beurteilen, da der Grossteil kurz nach dem Passagieren durch den Pilzbefall abgestorben ist. Klar ist, dass Vitamine für lebende in-vitro-Pflänzchen sind, da sie Enzymreaktionen katalysieren (Smith, 2013).

Die in-vitro-Pflänzchen wurden in diesem Versuch bei einer geringen Grösse auf das Bewurzelungsmedium passagiert. In der Literatur wird eine Grösse von 1 cm (Faccioli & Marani, 1998) bis 2 cm (z.B. Bhojwani & Dantu, 2013; Dziedzic & Jagła, 2013) angegeben. Dies macht Sinn, denn die Auxine, welche für die Bewurzelung eingesetzt werden, können in hohen Konzentrationen die Morphogenese der Pflänzchen beeinträchtigen. Zwar wurden Auxine bereits in den ersten beiden Medien verwendet, um die Zellteilung zu fördern, dies aber in deutlich geringeren Konzentrationen (Smith, 2013).

Nicht alle Inhaltsstoffe der Nährmedien sind thermostabil über eine längere Zeit. Smith (2013) empfiehlt deshalb, diese erst nach dem Autoklavieren via Filtersterilisation beizugeben.

6.3 Morphologische Beschreibung

Bei der Suche nach Symptomen an den Pflanzen / auf Bildern bzw. Hinweisen auf BRV in der Nationalen Datenbank Schweiz zur Erhaltung der pflanzengenetischen Ressourcen (2018) fiel auf, dass es oft schwierig ist, Symptome zu erkennen, wenn man nicht sehr vertraut ist mit der Morphologie von *Ribes nigrum* bzw. der unterschiedlichen Sorten. So sind Beschreibungen wie „Blütenblätter sind kleiner als normal“ schwierig zu interpretieren, wenn die normale Blütenblattgrösse einer gesunden Pflanze der entsprechenden Sorte nicht bekannt ist.

Jede der fünf untersuchten Pflanzen zeigte Symptome von BRV, manche deutlich, manche weniger deutlich. Die typische unregelmässige Verteilung über die ganze Pflanze war vorhanden. Es gab Pflanzen, deren Blattspreitenbasis bei manchen Blättern geschlossen war und bei anderen gerade. BE-526, welche gemäss der molekularen Untersuchung NICHT infiziert ist, zeigte Symptome. Zudem hatte sie aufgeblasene Knospen, was auf den Befall durch die Milbe hinweist. BE-526 zeigte aber weniger Symptome und hatte deutlich mehr Fruchtbehang als die anderen. Blütensymptome zeigten sich an keiner der Pflanzen. Zwischen den Beobachtungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit und jenen aus der Nationalen Datenbank (2018) zeigten sich vor allem bei der Blattspreitenbasis Unterschiede: Bei BE-470 und BE-648 war sie gemäss nationaler Datenbank (Bundesamt für Landwirtschaft, 2018) meist geschlossen. Bei den Beobachtungen im Rahmen dieser Arbeit wurde häufig eine offene bis gerade Blattspreitenbasis beobachtet. Dazu muss erwähnt werden, dass sich

in den 3-4 Jahren seit den letzten Einträgen in die nationale Datenbank (2018) die Symptome verändert haben können.

Die morphologischen Beobachtungen und die Daten aus der nationalen Datenbank zeigen, dass eine Viruserkennung allein aufgrund morphologischer Beobachtungen schwierig und vermutlich nicht immer möglich ist. Die unregelmässige Verteilung der Symptome über die Pflanze erschwert die Suche nach Symptomen. Hinzu kommt, dass aus Zeitgründen nur die positiv getesteten Pflanzen und lediglich eine negativ getestete morphologisch untersucht wurden. Wären alle getesteten Pflanzen auch im Hinblick auf die Morphologie untersucht worden, hätten wahrscheinlich deutlichere Unterschiede festgestellt werden können.

Bei der Suche und Analyse solcher Symptome darf nicht vergessen werden, dass Unterschiede zwischen den Sorten auch aufgrund der Sorteneigenschaften zustande kommen können und zahlreiche biotische und abiotische Faktoren bestimmte Symptome auslösen können. Ein gutes Beispiel dafür ist das Verrieseln, welches unterschiedliche Gründe haben kann. Trotzdem scheint die Kombination aus allen beobachteten Merkmalen zu zeigen, dass eine BRV-Infektion vorhanden ist.

Sollen die Pflanzen in der Sammlung in Zukunft alleine aufgrund ihrer äusserlichen Merkmale auf BRV untersucht werden, sollte ein System mit klar definierter Vorgehensweise entwickelt werden. Bei der Entwicklung eines solchen Systems muss die unregelmässige Verteilung des Virus über die Pflanze berücksichtigt werden.

7 Fazit & Ausblick

Die Virusfreimachung bei *R. nigrum* ist komplex und es müssen zahlreiche Faktoren beachtet werden. Es ist noch wenig Wissen vorhanden, auf welches zurückgegriffen werden kann. Für eine Wiederholung müssen die hier angewandten Methoden überarbeitet, angepasst und erprobt werden - Informationen dazu finden sich teilweise in der Diskussion. Es hat sich gezeigt, dass die Zeit für die Durchführung der Virusfreimachung in diesem Versuch zu knapp bemessen war.

Ist es das Ziel, die ganze Sammlung auf das Virus zu testen oder morphologisch zu untersuchen und virusfrei zu machen, so ist das eine umfangreiche Arbeit, welche etappenweise in Angriff genommen werden sollte. Soll eine (Teil-)Sammlung mit virusfreien Pflanzen angelegt werden, so muss diese genügend weit weg von der Ausgangssammlung, von Gärten und landwirtschaftlichen Betrieben sein, damit keine Milben in die neue Sammlung gelangen können. Zudem braucht es eine definierte Vorgehensweise, wie mit den Milben umgegangen wird, sollten sie trotzdem in der Sammlung auftauchen. Auch andere Krankheiten und Schädlingen müssen beachtet werden - es gilt aber nach wie vor, dass BRV und die *Cecidophyopsis*-Arten bei *R. nigrum* in situ den grössten Schaden anrichten können.

Wie realistisch die Restauration einer solchen Sammlung ist, ist nicht mit Sicherheit vorauszusagen. Sicher ist jedoch, dass sie viel Zeit, Arbeit und andere Ressourcen in Anspruch nehmen wird.

8 Literaturverzeichnis

- Adams, A. N. (1972). An Improved Medium for Strawberry Meristem Culture. *Journal of Horticultural Science*, 47 (2), 263–264. <https://doi.org/10.1080/00221589.1972.11514466>
- Adams, A. N. & Thresh, J. M. (1987). Virus and Viruslike Diseases of Black Currant - Reversion of Black Currant (Agriculture Handbook). In R.H. Converse (Hrsg.), *Virus diseases of small fruits* (Band no. 631). Washington, D.C: U.S. Government Printing Office.
- Ahmad, I., Khan, T., Ashraf, I., Nafees, M., Maryam, M. R. & Iqbal, M. (2013). Lethal effect of secondary metabolites on plant tissue culture. *American-Eurasian. J. Agric and Environ. Sci*, 13, 539–547.
- Andermatt Biocontrol. (2018). Suchergebnisse für: „Trauermücken“. *Andermatt Biocontrol*. Zugriff am 5.10.2018. Verfügbar unter: https://www.biocontrol.ch/de_bc/catalogsearch/result/?q=trauerm%C3%BCcken#isPage=1
- Bartha-Pichler, B., Frei, M., Kajtna, B. & Zuber, M. (2006). *Osterfee und Amazone: vergessene Bienenarten - neu entdeckt*. Baden München: AT-Verlag.
- Bhojwani, S. S. & Dantu, P. K. (2013). *Plant tissue culture: an introductory text*. New Delhi ; New York: Springer.
- Bibliographisches Institut GmbH (Hrsg.). (2018a). Atavismus, der. *Duden*. Zugriff am 28.8.2018. Verfügbar unter: <https://www.duden.de/rechtschreibung/Atavismus>
- Bibliographisches Institut GmbH (Hrsg.). (2018b). Reversion, die. Zugriff am 28.8.2018. Verfügbar unter: <https://www.duden.de/rechtschreibung/Reversion>
- Bundesamt für Landwirtschaft. (2018a). LEAFBASEBLADE_1-4 Deskriptor. *Erhaltung der pflanzengenetischen Ressourcen - Nationale Datenbank Schweiz*. Zugriff am 28.9.2018. Verfügbar unter: https://www.bdn.ch/descriptors/LEAFBASEBLADE_1-4/
- Bundesamt für Landwirtschaft. (2018b). Erhaltung der pflanzengenetischen Ressourcen - Nationale Datenbank Schweiz. Zugriff am 4.10.2018. Verfügbar unter: <https://www.bdn.ch/>

- Büttner, C. & Maiss, E. (2013). Viren. In H.-M. Poehling & J.-A. Verreet (Hrsg.), *Lehrbuch der Phytomedizin* (4. Aufl.). Stuttgart: Ulmer.
- Campbell, A. I. (1965). The inactivation of black currant reversion virus by heat therapy. In Agricultural Horticultural Research Station (Hrsg.), *Annual Report of the Agricultural and Horticultural Research Station (the National Fruit and Cider Institute)*. Bristol: University of Bristol.
- Cassells, A. C. & Tahmatsidou, V. I. (1997). Elimination of several bacterial isolates from meristem tips of Hydrangea spp. (Development in plant pathology). In A.C. Cassells (Hrsg.), *Pathogen and microbial contamination management in micropropagation*. Dordrecht ; Boston: Kluwer Academic Publishers.
- Cheong, E. J., Jeon, A. R., Kang, J. W., Mock, R., Kinard, G. & Li, R. (2014). In vitro elimination of Black raspberry necrosis virus from black raspberry (*Rubus occidentalis*). *Hortic Sci*, 41, 95–99.
- Dolan, A., MacFarlane, S. A., McGavin, G. J., Brennan, R. M. & McNicol, J. W. (2011). Blackcurrant reversion virus: Validation of an improved diagnostic test, accelerating testing in breeding and certification of blackcurrants. *Journal of Berry Research*, (1), 201–208.
- Duchefa Biochemie. (2018a). M0222 Murashige & Skoog medium including vitamins - Composition. *Duchefa Biochemie*. Zugriff am 12.9.2018. Verfügbar unter: <https://www.duchefa-biochemie.com/product/details/number/M0222/name/murashige-skoog-medium-including-vitamins>
- Duchefa Biochemie. (2018b). M0219 McCown Woody Plant medium - Composition. *Duchefa Biochemie*. Zugriff am 12.9.2018. Verfügbar unter: <https://www.duchefa-biochemie.com/product/details/number/M0219/name/mccown-woody-plant-medium>
- Duchefa Biochemie. (2018c). M0220 McCown Woody Plant medium including vitamins - Composition. *Duchefa Biochemie*. Zugriff am 15.10.2018. Verfügbar unter: <https://www.duchefa-biochemie.com/product/details/number/M0220/name/mccown-woody-plant-medium-including-vitamins>

- Dziedzic, E. & Jagła, J. (2013). Micropropagation of Rubus and Ribes spp. (Methods in molecular biology). In M. Lambardi, E.A. Ozudogru & S.M. Jain (Hrsg.), *Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants*. New York: Humana Press.
- Faccioli, G. & Marani, F. (1998). Virus Elimination by Meristem Tip Culture and Tip Micrografting. In A. Hadidi, R.K. Khetarpal & H. Koganezawa (Hrsg.), *Plant virus disease control*. St. Paul, Minn: APS Press.
- Fischer-Colbrie, P., Gross, M., Hluchy, M., Hofmann, U., Pleininger, S. & Stolz, M. (Hrsg.). (2015). *Atlas der Krankheiten, Schädlinge und Nützlinge im Obst- und Weinbau: mit umweltschonenden Strategien für gesunde Kulturen*. Graz: stv, Stocker.
- Focke, U. (1972). *Untersuchungen zur Biologie der Johannisbeergallmilbe Cecidophyopsis ribis Westw. und des Gallbildungsprozesses an Fulturjohannisbeeren (Ribes nigrum L, Ribes rubrum L.)*. Rostock: Universität Rostock, Fakultät für Biologie, Chemie und Agrarwissenschaften.
- George, E. F. & Sherrington, P. D. (1984). *Plant propagation by tissue culture: handbook of directory of commercial laboratories*. Basingstoke, Hants: Exegetics.
- George, R. A. T. & Fox, R. T. V. (2014). *Diseases of Temperate Horticultural Plants*. CABI.
- Hu, G., Dong, Y., Zhang, Z., Fan, X., Ren, F. & Li, Z. (2017). Efficacy of virus elimination from apple by thermotherapy coupled with in vivo shoot-tip grafting and in vitro meristem culture. *Journal of Phytopathology*, 165 (10), 701–706. <https://doi.org/10.1111/jph.12610>
- Hu, G., Dong, Y., Zhang, Z., Fan, X., Ren, F. & Zhou, J. (2015). Virus elimination from in vitro apple by thermotherapy combined with chemotherapy. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 121 (2), 435–443. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0714-6>
- Hu, G. J., Hong, N., Wang, L. P., Hu, H. J. & Wang, G. P. (2012). Efficacy of virus elimination from in vitro-cultured sand pear (Pyrus pyrifolia) by chemotherapy combined with thermotherapy. *Crop Protection*, 37, 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.02.017>

- Hu, G., Zhang, Z., Dong, Y., Fan, X., Ren, F. & Zhu, H.-J. (2015). Efficiency of virus elimination from potted apple plants by thermotherapy coupled with shoot-tip grafting. *Australasian Plant Pathology*, 44 (2), 167–173. <https://doi.org/10.1007/s13313-014-0334-3>
- Info Flora. (2018). *Ribes nigrum* L. *Info Flora*. Zugriff am 22.8.2018. Verfügbar unter: <https://www.infoflora.ch/de/flora/ribes-nigrum.html#status>
- Jones, A. T. (2000). Black currant reversion disease - the probable causal agent, eriophyid mite vectors, epidemiology and prospects for control. *Virus Research*, 71 (1), 71–84. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(00\)00189-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(00)00189-1)
- Jones, A. T., Lehto, K., Lemmetty, A., Latvala, S., Susi, P., McGavin, W. J. et al. (1996). Blackcurrant reversion disease - tracking down the causal agent A.T. Jones, K. Lehto 1 , A. Lemmetty 2 , S. Latvala 1 , P. Susi 3 , W. J. McGavin & S. Cox. Zugriff am 6.2.2018. Verfügbar unter: <http://www.fruitgateway.co.uk/pubs/file.asp?ID=326>
- Ko, W. H., Su, C. C., Chen, C. L. & Chao, C. P. (2009). Control of lethal browning of tissue culture plantlets of Cavendish banana cv. Formosana with ascorbic acid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 96 (2), 137–141. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9469-7>
- Lassois, L., Lepoivre, P., Swennen, R., van den Houwe, I. & Panis, B. (2013). Thermotherapy, Chemotherapy, and Meristem Culture in Banana (Methods in molecular biology). In M. Lambardi, E.A. Ozudogru & S.M. Jain (Hrsg.), *Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants*. New York: Humana Press.
- Latvala, S., Susi, P., Lemmetty, A., Cox, S., Jones, A. T. & Lehto, K. (1997). Ribes host range and erratic distribution within plants of blackcurrant reversion associated virus provide further evidence for its role as the causal agent of reversion disease. *Annals of Applied Biology*, 131 (2), 283–295. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1997.tb05157.x>
- Lemmetty, A., Latvala Kilby, S. & Lehto, K. (2001). Comparison of different isolates of Black currant reversion virus. *Acta Horticulturae*, (551), 45–50. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.551.6>

- Lemmetty, A., Latvala, S., T Jones, A., Susi, P., McGavin, W. & Lehto, K. (1997). Purification and Properties of a New Virus from Black Currant, Its Affinities with Nepoviruses, and Its Close Association with Black Currant Reversion Disease. *Phytopathology*, 87, 404–13. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.4.404>
- Lemmetty, A. & Lehto, K. (1999). Successful Back-inoculation Confirms the Role of Black Currant Reversion Associated Virus as the Causal Agent of Reversion Disease, 5.
- Lemmetty, A., Tikkanen, M., Tuovinen, T. & Lehto, K. (2004). Identification of different cecidophyopsis mites on ribes in Finland. *Acta Horticulturae*, 656, 115–118. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2004.656.17>
- Lizárraga, A., Ascasíbar, J. & González, M. L. (2017). Fast and Effective Thermotherapy Treatment for In Vitro Virus Eradication in Apple and Pear Trees. *American Journal of Plant Sciences*, 08 (10), 2474. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.810168>
- Lloyd, G. & McCown, B. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Combined Proceedings - International Plant Propagators' Society (USA)*.
- Maliogka, V. I., Skiada, F. G., Eleftheriou, E. P. & Katis, N. I. (2009). Elimination of a new ampelovirus (GLRaV-Pr) and Grapevine rupestris stem pitting associated virus (GRSPaV) from two *Vitis vinifera* cultivars combining in vitro thermotherapy with shoot tip culture. *Scientia Horticulturae*, 123 (2), 280–282. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.08.016>
- McCown, B. H. (2000). Special symposium: In vitro plant recalcitrance of woody and herbaceous perennial plants: Dealing with genetic predeterminism. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 36 (3), 149–154. <https://doi.org/10.1007/s11627-000-0030-6>
- McCown, B. H. (2013). Woody Shrubs and Trees. In R.H. Smith (Hrsg.), *Plant tissue culture: techniques and experiments* (Third edition.). Amsterdam: Academic Press.

- Mitchell, C., Brennan, R. M., Cross, J. V. & Johnson, S. N. (2011). Arthropod pests of currant and gooseberry crops in the U.K.: their biology, management and future prospects. *Agricultural and Forest Entomology*, 13 (3), 221–237. <https://doi.org/10.1111/j.1461-9563.2010.00513.x>
- Miyazaki, J., Tan, B. H. & Errington, S. G. (2010). Eradication of endophytic bacteria via treatment for axillary buds of *Petunia hybrida* using Plant Preservative Mixture (PPMTM). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 102 (3), 365–372. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9741-5>
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 (3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Panattoni, A., Luvisi, A. & Triolo, E. (2013). Review. Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 11 (1), 173–188.
- Postman, J., DeNoma, J. S. & Reed, B. M. (2005). Detection and Elimination of Viruses in USDA Hop (*Humulus lupulus*) germplasm collection. *Acta Horticulturae*, 668, 143–148. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.668.18>
- Příbylová, J., Špak, J., Petrzik, K., Kubelková, D. & Špaková, V. (2008). Sequence comparison and transmission of Blackcurrant reversion virus isolates in black, red and white currants with black currant reversion disease and full blossom disease symptoms. *European Journal of Plant Pathology*, 121 (1), 67–75. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9245-2>
- Reynard, J.-S. & Spring, J.-L. (2013). Thermotherapy applied to whole plant as a sanitation method against three grapevine viruses (GLRaV-1, GVA and GRSPaV). *14ème Rencontre de virologie végétale*.
- Schweizer Obstverband. (2014). Schwarze Johannisbeeren, die Stärkenden. *swissfruit*. Zugriff am 22.8.2018. Verfügbar unter: <http://www.swissfruit.ch/de/johannisbeeren>
- Schweizer Obstverband (Hrsg.). (2018). Beeren Anbauflächen 2018.

- Sedlák, J., Paprštejn, F., Špak, J., Příbylová, J. & Svobodová, L. (2011). Sanitation of currant cultivars. *Vědecké Práce Ovocnářské*, (22).
- Smith, G. R., Fletcher, J. D., Marroni, V., Kean, J. M., Stringer, L. D. & Vereijssen, J. (2017). Plant pathogen eradication: determinants of successful programs. *Australasian Plant Pathology*, 46 (3), 277–284. <https://doi.org/10.1007/s13313-017-0489-9>
- Smith, R. H. (2013). Meristem Culture for Virus-Free Plants. *Plant tissue culture: techniques and experiments* (Third edition.). Amsterdam: Academic Press.
- Stalažs, A. & Moročko-Bičevska, I. (2016). Species identification, host range and diversity of Cecidophyopsis mites (Acari: Trombidiformes) infesting Ribes in Latvia. *Experimental and Applied Acarology*, 69 (2), 129–153. <https://doi.org/10.1007/s10493-016-0024-7>
- Steinborn, H.-A. (1982). *Untersuchungen zur Biologie, Oekologie und Bekämpfung der Johannisbeergallmilbe, Cecidophyopsis ribis (Westw.)(Eriophyidae), sowie zum Resistenzverhalten der schwarzen Johannisbeere (Ribes nigrum L.)*. Inauguraldissertation. Giessen: Justus-Liebig-Universität Giessen.
- Susi, P. (2004). Black currant reversion virus, a mite-transmitted nepovirus. *Molecular Plant Pathology*, 5 (3), 167–173. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00217.x>
- Tao, F., Zhang, Z., Zhou, J., Yao, N. & Wang, D. (2007). Contamination and browning in tissue culture of Platanus occidentalis L. *Forestry Studies in China*, 9 (4), 279–282. <https://doi.org/10.1007/s11632-007-0044-9>
- Titov, S., Bhowmik, S. K., Mandal, A., Alam, M. S. & Uddin, S. N. (2006). Control of Phenolic Compound Secretion and Effect of Growth Regulators for Organ Formation from Musa spp. cv. Kanthali Floral Bud Explants. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 2 (3), 97–104. <https://doi.org/10.3844/ajbbbsp.2006.97.104>
- Vagiri, M. (2012). *BLACK CURRANT (Ribes nigrum L.) – AN INSIGHT INTO THE CROP*.
- Vukovits, G. (2005). *Die wichtigsten Obstkrankheiten* (Praxisbuch) (3. Aufl.). Graz: Stocker.

- Wang, Q., Cuellar, W. J., Rajamäki, M.-L., Hirata, Y. & Valkonen, J. P. T. (2008). Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. *Molecular Plant Pathology*, 9 (2), 237–250. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00456.x>
- Wiethold, J. (2016). Red currant *Ribes rubrum* and black currant *Ribes nigrum* as cultivated food plants in late medieval and early modern Europe: a summarizing view on botany, taxonomy, etymology, iconography and the archaeobotanical and historical evidence (Histoire des savoirs). In M.-P. Ruas (Hrsg.), *Des fruits d'ici et d'ailleurs: regards sur l'histoire de quelques fruits consommés en Europe*. Montreuil: Omniscience.
- Wood, G. A. (1989). Propagation, virus-screening and heat therapy of northern hemisphere imports of *Ribes*, *Rubus*, and *Vaccinium*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 17 (3), 271–274. <https://doi.org/10.1080/01140671.1989.10428043>
- Zuļģe, N., Gospodaryk, A. & Moročko-Bičevska, I. (2018). Occurrence and genetic diversity of Blackcurrant reversion virus found on various cultivated and wild *Ribes* in Latvia. *Plant Pathology*, 67 (1), 210–220. <https://doi.org/10.1111/ppa.12716>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strauch in der Einführungssammlung (links) und Beeren von <i>R. nigrum</i> (rechts). (Quelle rechts: Colourbox).....	1
Abbildung 2: <i>R. nigrum</i> wird in der Medizin (links) und als Nahrungsmittel, z.B. als Likör oder Eis, verwendet. (Quellen: Links: https://goo.gl/images/DSLv6X , Mitte & Rechts Colourbox)	2
Abbildung 3: Die Karte (links) zeigt die Lage der Einführungssammlung innerhalb der Gemeinde Riehen BS (Koordinaten: 2'616'746, 1'269'796). Das Luftbild zeigt die Einführungssammlung von nahe. (Quelle: map.geo.admin.ch)	3
Abbildung 4: Die Blätter sind weniger gelappt. (Quelle linkes Bild: Lene Carl)	4
Abbildung 5: Ausprägungen der Blattspreitenbasis. Links: geschlossen. Mitte: offen. Rechts: gerade. Die Blätter mit der geschlossenen und der offenen Blattspreitenbasis sind recht scharf gezähnt.	5
Abbildung 6: Gesunde Blüten. Links: es ist die einfache Anzahl Kelch- und Blütenblätter vorhanden. Mitte: Staubbeutel sind vorhanden, der Griffel ist nicht verlängert. Rechts: Flaumhaare sind vorhanden.....	5
Abbildung 7: Elektronenmikroskop-Aufnahme von <i>C. ribis</i> . (Quelle: Jones (2000))	8
Abbildung 8: Links sind gesunde, rechts befallene Knospen abgebildet. Die Verfaltungen sind unten rechts gut sichtbar. (Quelle untere Bilder: Jones (2000)).....	10
Abbildung 9: Schematische Darstellung einer Knospe. Das Meristem (gelb) ist von Primordialblättchen (grün) umhüllt. Zwischen den Primordialblättchen sitzen Axillarknospen (rot) an der Spindel (blau).....	11
Abbildung 10: Die Einführungssammlung und ein einzelner Strauch zum Zeitpunkt der ersten Probenentnahme am 02.03.2018.....	16
Abbildung 11: Die Ruten von BE-898 vor und nach der Auswahl der Bestgeeigneten.	17
Abbildung 12: Schema für das Zuschneiden der Steckhölzer und der Proben für die Analyse pro beprobte Pflanze.....	18
Abbildung 13: Fertig zugeschnittene Proben für die Molekularanalyse (links) und Steckhölzer (rechts)	18
Abbildung 14: Angeritztes (oben) und anschliessend mit Hormonpulver benetztes (unten) Steckholz.	20
Abbildung 15: Die Steckhölzer wurden jeweils zu zweit in einen Topf gesteckt.....	20

Abbildung 16: links oben: Knospe mit Blatt, links unten: Knospe ohne Blatt. Rechts: Knospe ohne Blatt, die Blattrarbe ist deutlich sichtbar.....	24
Abbildung 17: Links: Vom Stück abgeschnittene Knospe mit Knospenschuppen und Blattanlagen. Mitte: Knospe mit teilweise nackter Achse. Rechts: Knospe, bei welcher die nackte Achse bereits abgetrennt wurde. Die gelblichen Punkte sind Harzdrüsen.	25
Abbildung 18: Bakterienbefallene in-vitro-Pflänzchen (links) wurden in Ethanol gewaschen und danach passagiert. Pilzbefallene in-vitro-Pflänzchen (rechts) wurden entfernt.	26
Abbildung 19: Links & Mitte (15.03.2018): Die Steckhölzer trieben rasch aus und nahmen eine blasse Farbe an. Rechts (21.03.2018): im Klimaschrank wurden sie rasch grün.	28
Abbildung 20: Links (28.03.2018): Erste Wurzelansätze. Mitte & Rechts (04.04.2018): Verlängerte Wurzelansätze. Der Bereich des angeritzten Kambiums ist mit einem roten Pfeil markiert.	28
Abbildung 21: Erfolgreich ausgetriebene Knospen (13.04.2018). Im mittleren Bild ist eine Blüte sichtbar.	29
Abbildung 22: Stand 29.04.2018. Rechts: Der Austrieb ist verwelkt und vertrocknet. Mitte: der Blattrand der hinteren Blätter begann sich einzurollen. Rechts: Gesunder Austrieb.	30
Abbildung 23: Stand 04.05.2018. Links: Gänzlich vertrocknete Knospe. Mitte: Verschwommene gelbe Flecken. Rechts: Auch grössere Austriebe verwelkten.	30
Abbildung 24: Stand 28.05.2018. Nur ein Steckholz von BE-470 (links) und einige Test-Steckhölzer (Beispiel, rechts) überlebten die Thermotheapie.	30
Abbildung 25: Der Unterirdische Teil der abgestorbenen Steckhölzer. Links: Löcher anstelle der Wurzeln. Mitte: Trauermückenlarve unter der Rinde. Rechts: Es war kein Mark mehr vorhanden.	31
Abbildung 26: Überlebende Steckhölzer. Sie hatten Wurzeln direkt unterhalb des oberirdischen Triebes oder verteilt über die ganze obere Hälfte.	31
Abbildung 27: Stand 09.07.2018. Links & Mitte: Ausgetriebenes und nicht ausgetriebenes in-vitro-Pflänzchen von BE-790. Rechts: in-vitro-Pflänzchen des thermotherapierten BE-470. Die braunen unteren Bereiche sind im rechten Bild am besten sichtbar.	32
Abbildung 28: Abgestorbene in-vitro-Pflänzchen am 02.08.2018. Links: Ledrige Knospenschuppen mit Bakterienschleim. Rechts: Der innere, weiche Teil.	32
Abbildung 29: Stand 25.08.2018. Links: Nur die äusserste Schicht des braunen Teils ist ledrig. Der obere Teil ist noch grün, die Blättchen allerdings abgestorben. Mitte: Abgeschabte, bröckelige Schicht. Rechts: Lebendes in-vitro-Pflänzchen nach dem Abschaben der Schicht.	33

Abbildung 30: Stand 25.08.2018. Links: Ledrige Verdickung an den Blättchen. Rechts: Punktuelle Veränderung an einem abgebrochenen Blatteil.	34
Abbildung 31: Oben links: Milben auf dem in-vitro-Pflänzchen. Alle anderen Bilder sind Aufnahmen aus dem Mikroskop. Der schwarze Balken ist jeweils 100 µm lang.	35
Abbildung 32: Geschwollene Knospen von BE-220 (links) und BE-505 (rechts)	37
Abbildung 33: Normale Blütenorgane (einfache Anzahl Kelch- und Blütenblätter, Staubbeutel vorhanden, Griffel nicht verlängert). Auf dem rechten Bild sind Flaumhaare sichtbar.	37
Abbildung 34: Oben: Die Blätter sind asymmetrisch und haben weniger Lappen als normal. Mitte: Auf dem linken und dem mittleren Bild sind Blätter mit stark gesägten Zähnen. Das rechte Bild zeigt eine Blattachselknospe, welche im Juni bereits wieder austrieb. Unten: Die verschiedene Ausprägungen der Blattspreitenbasis von geschlossen (links) zu gerade (rechts).	39
Abbildung 35: : Je eine Grappe mit typischer Menge an Fruchtbehang. V.l.n.r.: BE-526, BE-108, BE-790, BE-648, BE-470	40

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: zeitlicher Ablauf des praktischen Teils	15
Tabelle 2: Die vier Schritte der Thermotheapie (* gemessene Temperaturen je nach Loggertyp → USB / iButton), siehe auch in Anhang II)	21
Tabelle 3: Ergebnisse der molekularen Analyse I.....	27
Tabelle 4: Beobachtungen vom 02.03.2018, sowie frühere Beobachtungen von Martin Frei.....	36
Tabelle 5: Morphologische Eigenschaften der Blüten am 24.04.2018	37
Tabelle 6: Morphologische Eigenschaften der Blätter und Triebe am 24.04.2018 und 10.06.2018	38
Tabelle 7: Einige morphologische Eigenschaften der Früchte	40
Tabelle 8: Informationen aus der Nationalen Datenbank.....	41
Tabelle 9: Die beprobten Sorten inkl. Sortenname.....	62
Tabelle 10: Die verschiedenen Phasen in der Wachstumskammer.....	63
Tabelle 11: Rezeptur Initiationsmedium	64
Tabelle 12: Rezeptur Multiplikationsmedium	65
Tabelle 13: Rezeptur Bewurzelungsmedium (inkl. fehlender Vitamine)	66
Tabelle 14: Vergleich der empfohlenen, der verwendeten und der originalen Rezeptur für Initiation und Multiplikation	67
Tabelle 15: Vergleich der empfohlenen und der eigentlich verwendeten Rezeptur für die Bewurzelung	68

Anhang I: Beprobte Pflanzen

Tabelle 9 enthält eine Liste der beprobten Sorten inkl. dem Sortennamen.

Tabelle 9: Die beprobten Sorten inkl. Sortenname.

Datum der Probenahme: 02.03.2018	
BE-Nr.	Sortenname
103	Silvergieters
108	Schwarze Johannisbeere aus dem Autal
217	Mendip Cross
218	Noir de Bourgogne
219	Roodknop
220	Rosenthals Langtraubige
308	Schwarze Johannisbeere von Wattwil
390	Schwarze Johannisbeere von Gretzenbach
455	Boskoop Giant
470	Schwarze Johannisbeere von Orpund
505	Schwarze Johannisbeere von Bevaix
526	Schwarze Johannisbeere von Osogna
609	Schwarze Johannisbeere von Le Brassus
611	Schwarze Johannisbeere von Schönried
613	Schwarze Johannisbeere von Chardonne
648	Westwick Choice
790	Schwarze Traube
898	Schwarze Johannisbeere von Lettland (Wildform)
911	Titania
938	Tenah

Anhang II: Temperaturen in der Wachstumskammer

Die Temperatur und die Luftfeuchtigkeit in der Wachstumskammer wurden - aufgrund der Ungenauigkeiten der internen Logger - mittels je sechs USB-Loggern und sechs iButton-Loggern überwacht. Die Logger waren regelmässig in der Wachstumskammer verteilt. In Tabelle 10 sind die Durchschnittstemperaturen beider Loggertypen nach Phase aufgelistet:

Tabelle 10: Die verschiedenen Phasen in der Wachstumskammer.

Phase	Datum	Temperatur IST Ø [°C]		Temperatur SOLL [°C]
		USB-Logger	iButton-Logger	
0	bis 18.04.2018	10	10	10
I	19.04.2018 - 20.04.2018	12	12	12
	21.04.2018 - 22.04.2018	14	14	14
	23.04.2018 - 24.04.2018	16	16	16
	25.04.2018 - 26.04.2018	18	18	18
	27.04.2018 - 28.04.2018	20	20.5	20
	29.04.2018 - 01.05.2018	22	22	22
	02.05.2018	24	25	24
II	02.05.2018 - 23.05.2018	24	25	24
III	23.05.2018 - 24.05.2018	26.5	27	26
	25.05.2018 - 26.05.2018	28.5	29.5	28
	27.05.2018 - 29.05.2018	31	31.5	30
	30.05.2018	32	32.5	32
	31.05.2018	34	34.5	34
IV	31.05.2018 - 11.06.2018	34	34.5	34

Anhang III: Rezeptur der Nährmedien

Tabelle 11 enthält die verwendete Rezeptur für das Initiationsmedium. Die Rezeptur basiert auf dem Medium *M0222 Murashige & Skoog Medium including vitamins* (Duchefa Biochemie, 2018a).

Tabelle 11: Rezeptur Initiationsmedium

Inhaltsstoff	Konzentration [mg L ⁻¹]	bereits enthalten im MS Medium
CaCl ₂	332.02	
NH ₄ NO ₃	1650.0	
KNO ₃	1900.0	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	
KH ₂ PO ₄	170.0	
H ₃ BO ₃	6.2	
KI	0.83	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	
MgSO ₄ ·4H ₂ O	180.54	
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.90	
CuSO ₄ ·7H ₂ O	0.025	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	
FeNa-EDTA	36.7	
Glycin	2.00	
Myo-Inositol	100.0	
Nicotinsäure	0.5	
Pyridoxin HCl	0.5	
Thiamin HCl	0.1	
BA	2.0	zusätzlich
IBA	0.5	
GA ₃	0.1	
Saccharose	30'000	
Agar	7'000	
einstellen auf pH 5.7		

Tabelle 12 enthält die verwendete Rezeptur für das Multiplikationsmedium. Die Rezeptur basiert auf dem Medium *M0222 Murashige & Skoog Medium including vitamins* (Duchefa Biochemie, 2018a).

Tabelle 12: Rezeptur Multiplikationsmedium

Inhaltsstoff	Konzentration [mg L ⁻¹]	
CaCl ₂	332.02	bereits enthalten im MS Medium
NH ₄ NO ₃	1650.0	
KNO ₃	1900.0	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	
KH ₂ PO ₄	170.0	
H ₃ BO ₃	6.2	
KI	0.83	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	
MgSO ₄ ·4H ₂ O	180.54	
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.90	
CuSO ₄ ·7H ₂ O	0.025	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	
FeNa-EDTA	36.7	
Glycin	2.00	
Myo-Inositol	100.0	
Nicotinsäure	0.5	
Pyridoxin HCl	0.5	
Thiamin HCl	0.1	
BA	1.0	zusätzlich
IBA	0.1	
GA ₃	-	
Saccharose	30'000	
Agar	7'000	
einstellen auf pH 5.7		

Tabelle 13 enthält die verwendete Rezeptur für das Bewurzelungsmedium. Die Rezeptur basiert auf dem *M0219 McCown Woody Plant medium* (2018b). Die fehlenden Vitamine sind der Vollständigkeit halber ebenfalls aufgelistet. Da aus Versehen das Medium verwendet worden war, sind zur Ergänzung die fehlenden Vitamine (Duchefa Biochemie, 2018c) ebenfalls aufgelistet (ohne Mengenangaben)

Tabelle 13: Rezeptur Bewurzelungsmedium (inkl. fehlender Vitamine)

Inhaltsstoff	Konzentration (mg L ⁻¹)	
CaCl ₂	72.5	bereits enthalten im WP Medium
NH ₄ NO ₃	400.0	
Ca(NO ₃) ₂ ·2H ₂ O	471.26	
K ₂ SO ₄	990.00	
KH ₂ PO ₄	170.0	
H ₃ BO ₃	6.2	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	
MgSO ₄ ·4H ₂ O	180.54	
MnSO ₄ ·H ₂ O	22.30	
CuSO ₄ ·7H ₂ O	0.25	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	
FeNaEDTA	36.7	
Glycin		fehlend
Myo-Inositol		
Nicotinsäure		
Pyridoxin HCl		
Thiamin HCl		
IBA	2.0	zusätzlich
IAA	5.0	
Saccharose	30'000	
Agar	7'000	
einstellen auf pH 5.7		

Anhang IV: Vergleich der Rezepturen

Tabelle 14 enthält den Vergleich der Rezepturen mit MS-Medium für Initiation und Multiplikation. Verglichen werden die empfohlene Rezeptur (Dziedzic & Jagła, 2013), die verwendete Rezeptur (Duchefa Biochemie, 2018a) und die Originalrezeptur (Murashige & Skoog, 1962).

Tabelle 14: Vergleich der empfohlenen, der verwendeten und der originalen Rezeptur für Initiation und Multiplikation

Inhaltsstoff	Konzentration (mg L ⁻¹)			Kommentar
	empfohlen	verwendet	Original	
CaCl ₂	332.02	332.02	440	Originalrezeptur enthält wenig mehr als die anderen beiden
NH ₄ NO ₃	1650	1650	1650	
KNO ₃	1900	1900	1900	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.025	0.025	
KH ₂ PO ₄	170	170	170	
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	6.2	
KI	0.83	0.83	0.83	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25	0.25	
MgSO ₄ ·4H ₂ O	180.54	180.54	370	Originalrezeptur enthält gut das Doppelte der anderen beiden
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.9	16.9	22.3	
CuSO ₄ ·7H ₂ O	0.025	0.025	0.025	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	8.6	8.6	
FeNa-EDTA	73.4	36.7	-	Dziedzic & Jagła verwenden doppelt so viel FeNa-EDTA wie Duchefa. Murashige & Skoog geben die beiden Nährstoffe in anderer Form hinzu. Die Gehalte der drei Medien wurde Stöchiometrisch analysiert - die Anteile der beiden Nährstoffe sind nicht ganz gleich
Na ₂ -EDTA	-	-	37.3	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	-	-	27.8	
Glycin	2	2	2	
Myo-Inositol	100	100	100	
Nicotinsäure	0.5	0.5	0.5	
Pyridoxin HCl	0.5	0.5	0.5	
Thiamin HCl	0.5	0.1	0.1	Duchefa orientiert sich am Original, Dziedzic & Jagła haben den Anteil verfünffacht.

Tabelle 15 enthält den Vergleich der Rezepturen mit Woody Plant Medium für die Bewurzelung. Verglichen werden die empfohlene Rezeptur (Dziedzic & Jagła, 2013) und die Rezeptur, welche eigentlich hätte verwendet werden sollen (Duchefa Biochemie, 2018c). Die im Versuch verwendete Rezeptur ist in Anhang zu finden. Auf das Original (Lloyd & McCown, 1980) kann weder digital noch über ein Buch zugegriffen werden.

Tabelle 15: Vergleich der empfohlenen und der eigentlich verwendeten Rezeptur für die Bewurzelung

Inhaltsstoff	Konzentration (mg L ⁻¹)		Kommentar
	empfohlen	eigentlich verwendet	
CaCl ₂	72.5	72.5	
NH ₄ NO ₃	400	400	
Ca(NO ₃) ₂ ·2H ₂ O	471.26	471.26	
K ₂ SO ₄	990	990	
KH ₂ PO ₄	170	170	
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25	
MgSO ₄ ·4H ₂ O	180.54	180.54	
MnSO ₄ ·H ₂ O	22.3	22.3	
CuSO ₄ ·7H ₂ O	0.25	0.25	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	8.6	
FeNaEDTA	73.4	36.7	Dziedzic & Jagła verwenden das Doppelte
Glycin	2	2	
Myo-Inositol	100	100	
Nicotinsäure	0.5	0.5	
Pyridoxin HCl	0.5	0.5	
Thiamin HCl	1	1	